

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509970

(P2004-509970A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004. 4. 2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 21/04	C 0 7 H 21/04	B 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	4 C 0 5 7
A 6 1 K 31/7115	A 6 1 K 31/7115	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7125	A 6 1 K 31/7125	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	Z 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 146 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-531140 (P2002-531140)	(71) 出願人	398032717
(86) (22) 出願日	平成13年9月26日 (2001. 9. 26)		ハイブリドン・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月26日 (2003. 3. 26)		HYBRIDON, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/030137		アメリカ合衆国02139マサチューセツ
(87) 国際公開番号	W02002/026757		州ケンブリッジ、バッサー・ストリート
(87) 国際公開日	平成14年4月4日 (2002. 4. 4)		345番
(31) 優先権主張番号	60/235, 452	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成12年9月26日 (2000. 9. 26)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	カンディマツラ, エカンバー アール.
(31) 優先権主張番号	60/235, 453		アメリカ合衆国マサチューセツ州017
(32) 優先日	平成12年9月26日 (2000. 9. 26)		72、サウスボロー、キャンドルウッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		レーン 6
(31) 優先権主張番号	09/712, 898		
(32) 優先日	平成12年11月15日 (2000. 11. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 位置的化学変化による免疫刺激オリゴヌクレオチドアナログの免疫刺激活性の調節

(57) 【要約】

本発明は、免疫治療用途において、免疫刺激剤としてのオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの治療的な使用に関する。本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物による免疫応答を増強するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式5'-ピリミジン-プリン-3'、式中、ピリミジンは非天然ピリミジンヌクレオシドであり、およびプリンは天然または非天然プリンヌクレオシドである、で表される免疫刺激ジヌクレオチドを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

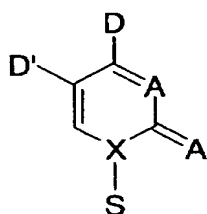
【請求項2】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式C*_pG、式中、C*はシチジンアナログであり、Gはグアノシン、2'-デオキシグアノシンまたはグアノシンアナログであり、およびpは、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートからなる群から選択されるヌクレオチド間結合である、で表される免疫刺激ジヌクレオチドを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項3】

非天然ピリミジンヌクレオシドが、式(I)：

【化1】



(I)

式中、Dは水素結合供与体であり、D'は水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子吸引基および電子供与基からなる群から選択され、Aは水素結合受容体または親水基であり、Xは炭素または窒素であり、およびSはペントースまたはヘキソース糖環である、を有し、但し、式(I)で表されるピリミジンヌクレオシドはシチジンまたはデオキシシチジンではない、請求項1に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項4】

非天然ピリミジンヌクレオシドが、非天然に生ずるピリミジン塩基を含む、請求

項3に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項5】

非天然に生ずるピリミジン塩基が、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、N4-アルキルシトシンおよび4-チオウラシルからなる群から選択される、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項6】

非天然に生ずるピリミジン塩基が、5-ヒドロキシシトシンおよびN4-エチルシトシンからなる群から選択される、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項7】

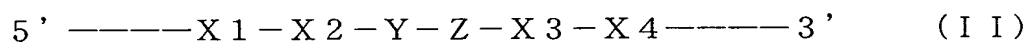
式(I)で表される非天然ピリミジンヌクレオシドが、非天然に生ずる糖部分を含む、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項8】

非天然に生ずる糖部分がアラビノースである、請求項7に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項9】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式(II)：



式中、

Yは、シチジン、2'-デオキシシチジンまたは非天然ピリミジンヌクレオシドであり；

Zは、グアノシン、2'-デオキシグアノシンまたは非天然プリンヌクレオシドであり；

X1は、天然に生ずるヌクレオシドまたはC3-アルキルリンカー、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオールリンカーおよびβ-L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

X2は、天然に生ずるヌクレオシドまたはアミノリンカーである免疫刺激部分であり；

X3は、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートであ

る免疫刺激部分であり；

X4は、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートおよび2'-O-メチルリボヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

但し、X1、X2、X3およびX4の少なくとも1つが免疫刺激部分である、で表される免疫刺激ドメインを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

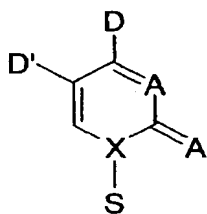
【請求項10】

Yが、非天然ピリミジンヌクレオシドである、請求項9に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項11】

Yが、式(I)：

【化2】

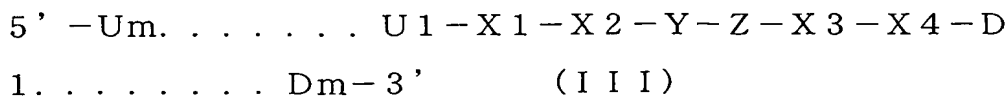


(I)

式中、Dは水素結合供与体であり、D'は水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子吸引基および電子供与基からなる群から選択され、Aは水素結合受容体または親水基であり、Xは炭素または窒素であり、およびSはペントースまたはヘキソース糖環である、を有し、但し、Yはシチジンまたはデオキシシチジンではない、請求項10に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項12】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式(III)：



式中：

Yは、非天然ピリミジンヌクレオシドであり；

Zは、グアノシン、2'-デオキシグアノシンまたは非天然プリンヌクレオシドであり；

各Xは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；

式中、Um-U1は、上流増強ドメインを示し、ここで、各Uは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；

式中、D1-Dmは、下流増強ドメインを示し、ここで、各Dは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；および

mは、各場合において、0～30の数を示す、

で表される配列を含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項13】

少なくとも1つのX、UまたはDが、免疫刺激部分である、請求項12に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項14】

X1が、天然に生ずるヌクレオシドまたはC3-アルキルリンカー、2-アミノブチルー1, 3-プロパンジオールリンカーおよびβ-L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

X2が、天然に生ずるヌクレオシドまたはアミノリンカーである免疫刺激部分であり；

X3が、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートである免疫刺激部分であり；

X4が、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートおよび2'-O-メチルリボヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

U1が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1', 2'-ジデオキシリボース、C3-リンカーおよび2'-O-メチルリボヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

U2が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1', 2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スペーサー18、3'-デオキシヌクレオシド、ヌクレオシドメチルホスホネート、β-L-デオキシヌクレオシドおよび2'-O-プロパルギ

ルリボヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

U3が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1'，2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スパーサー9、スパーサー18、ヌクレオシドメチルホスホネートおよび2'-5'結合からなる群から選択される免疫刺激部分であり；

D1が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1'，2'-ジデオキシリボースおよびヌクレオシドメチルホスホネートからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

D2が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1'，2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スパーサー9、スパーサー18、2-アミノブチル-1，3-プロパンジオールリンカー、ヌクレオシドメチルホスホネートおよびβ-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；および

D3が、天然に生ずるヌクレオシドまたは3'-デオキシヌクレオシド、2'-O-プロパルギルリボヌクレオシドおよび2'-5'結合からなる群から選択される免疫刺激部分である；

請求項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項15】

U2およびU3が、両方ともに、1'，2'-ジデオキシリボース、C3-リンカーおよびβ-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される同一の免疫刺激部分である、請求項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項16】

U3およびU4が、両方ともに、ヌクレオシドメチルホスホネートおよび2'-O-メトキシエチルリボヌクレオシドからなる群から選択される同一の免疫刺激部分である、請求項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項17】

U5およびU6が、両方ともに、1'，2'-ジデオキシリボースおよびC3-リンカーからなる群から選択される同一の免疫刺激部分である、請求項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項18】

X1およびU3が、両方ともに、1'，2'-ジデオキシリボースである、請求

項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項19】

D2およびD3が、両方ともに、1', 2'-ジデオキシリボースおよびβ-L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される同一の免疫刺激部分である、請求項13に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項20】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって：

式5'-ピリミジン-プリン-3'、式中、ピリミジンは天然または非天然ピリミジンヌクレオシドであり、およびプリンは天然または非天然プリンヌクレオシドである、で表される免疫刺激ジヌクレオチド；

3'-3'結合；および

1つまたは2つのアクセス可能な5'-末端；

を含み、但し、オリゴヌクレオチドは、HIV-1のgagまたはtat遺伝子に相補的ではない、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項21】

オリゴヌクレオチドが、2つのアクセス可能な5'-末端を含む、請求項20に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項22】

免疫刺激ジヌクレオチドが、非天然ピリミジンヌクレオシドを含む、請求項20に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項23】

非天然に生ずるピリミジン塩基を含むジヌクレオチドアナログを免疫刺激ドメインに導入することを含む、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項24】

免疫刺激部分を免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインに導入することを含む、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項25】

3' - 3' 結合をオリゴヌクレオチドに導入することを含む、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項26】

患者に免疫応答を引き起こすための方法であって、請求項1～22のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項27】

オリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物が、抗生物質、抗原、アレルゲン、ワクチン、抗体、細胞毒性剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、遺伝子療法ベクター、DNAワクチン、アジュバントまたはこれらの組み合わせと組み合わせて投与される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物が、抗原またはワクチンと結合している、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

結合がオリゴヌクレオチド化合物の3' - 末端へのものである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

病原体による疾患を有する患者を治療的に処置するための方法であって、請求項1～22のいずれかに記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項31】

病原体がウイルスである、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

病原体が寄生虫である、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

病原体がバクテリアである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】

癌患者を処置するための方法であって、請求項1～22のいずれかに記載の免疫

刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項35】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物が、化学療法化合物と組み合わせて投与される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

自己免疫疾患を処置するための方法であって、請求項1～22のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項37】

自己免疫疾患が自己免疫性の喘息である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

気道炎症またはアレルギーを処置するための方法であって、請求項1～22のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景発明の分野

本発明は、免疫治療用途における、免疫刺激剤としてのオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの治療的な使用に関する。

【0002】

関連技術の概要

オリゴヌクレオチドは、現代の分子生物学において、不可欠のツールとなっており、PCRの診断プローブ法から遺伝子発現のアンチセンス阻害および免疫治療用途に至るまで、多種多様の技術に使用されている。

オリゴヌクレオチドのこの広範囲に及ぶ使用は、オリゴヌクレオチドを合成するための迅速、安価かつ効率的な方法に対する増大する需要をもたらした。

【0003】

アンチセンスおよび診断用途のためのオリゴヌクレオチドの合成は、現在では、日常的に達成できる。例えば、Methods in Molecular Biology, Vol 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs pp. 165-189 (S. Agrawal, Ed., Humana Press, 1993); Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., 1991); and Uhlmann and Peyman, *supra* a. Agrawal and Iyer, Curr. Op. in Biotech. 6: 12 (1995); および Antisense Research and Applications (Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993) を参照。初期の合成方法は、ホスホジエステルおよびホスホトリエステル化学を含んでいた。

【0004】

Khorana et al., J. Molec. Biol. 72: 209 (1972) には、オリゴヌクレオチド合成のためのホスホジエステル化学が開示されている。Reese, Tetrahedron Lett. 34: 3143-3179 (1978) には、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの合成のためのホスホトリエステル化学が開示されている。これらの初期の方法は、大幅に、合成において一層効率的なホスホラミダイトおよびH-ホスホネート方法に移行した。Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981) には、ポリヌクレオチド合成におけるデオキシヌクレオシドホスホラミダイトの使用が開示されている。Agrawal and Zamecnik, 米国特許第5, 149, 798号(1992) には、H-ホスホネート方法による最適化されたオリゴヌクレオチド合成が開示されている。

【0005】

これらの現代的な方法の両方は、種々の修飾されたヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドの合成に使用されている。Agrawal and Goodchild, Tetrahedron Lett. 28: 3539-3542 (1987) には、ホスホラミダイト化学を用いるオリゴヌクレオチドメチルホスホネートの合成が教示されている。Connolly et al., Biochemistry 23: 3443 (1984) には、ホスホラミダイト化学を用いるオリゴヌクレオチドホスホロチオエートの合成が開示されている。Jager et al., Biochemistry 27: 7237 (1988) には、ホスホラミダイト化学を用いるオリゴヌクレオチドホスホラミデートの合成が開示されている。Agrawal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7079-7083 (1988) には、H-ホスホネート化学を用いるオリゴヌクレオチドホスホラミデートおよびホスホロチオエートの合成が開示されている。

【0006】

さらに最近、数人の研究者が、免疫治療用途における免疫刺激剤としてのオリゴヌクレオチドの使用の有効性を例証した。ホスホジエステルおよびホスホロチオ

エートオリゴヌクレオチドが免疫刺激を誘導することができるという観察は、治療のツールとして、この副作用を開発する興味を引き起こした。これらの取り組みは、ジヌクレオチドCpGを含有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを対象とした。

【0007】

Kuramoto et al., Jpn. J. Cancer Res. 83: 1128-1131 (1992) には、CpGジヌクレオチドを含むパリンドロームを含有するホスホジエステルが、インターフェロン- α および γ 合成を誘導し、並びにナチュラルキラー活性を増強することができることが教示されている。Krieg et al., Nature 371: 546-549 (1995) には、ホスホロチオエートCpG含有オリゴヌクレオチドが、免疫刺激性であることが開示されている。Liang et al., J. Clin. Invest. 98: 1119-1129 (1996) には、このようなオリゴヌクレオチドが、ヒトB細胞を活性化させることが開示されている。

【0008】

Pisetsky, D. S.; Rich C. F., Life Sci. 54: 101 (1994) には、CpG-オリゴの免疫刺激活性が、さらに、これらのオリゴ上のホスホロチオエート(PS)バックボーンの存在により増強されることが教示されている。Tokunaga, T.; Yamamoto, T.; Yamamoto, S. Jap. J. Infect. Dis. 52: 1 (1999) には、CpG-オリゴの免疫刺激活性が、CpG-モチーフの位置およびCpG-モチーフの近傍に位置する配列に依存することが教示されている。CpG-オリゴによる免疫刺激の活性化機構は十分に理解されていない。しかし、Yamamoto, T.; Yamamoto, S.; Kataoka, T.; Tokunaga, T., Microbiol. Immunol. 38: 831 (1994) には、CpG-オリゴが、まだ特徴づけされていない細胞内レセプター/タンパク質に結合することにより、免疫カスケードを誘導することが示唆されている。

【0009】

数人の研究者は、これが、最終的に、ストレスキナーゼ経路、NF- κ Bの活性化およびIL-6、IL-12、 γ -IFNおよびTNF- α など種々のサイトカインの誘導を引き起こすことを見出した（例えば、Klinman, D. M. ; Yi, A. K. ; Beaucage, S. L. ; Conover, J. ; Krieg, A. M. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 2879 (1996) ; Sparwasser, T. ; Miethke, T. ; Lipford, G. B. ; Erdmann, A. ; Haecker, H. ; Heeg, K. ; Wagner, H. , Eur. J. Immunol. 27: 1671 (1997) ; Lipford, G. B. ; Sparwasser, T. ; Bauer, M. ; Zimmermann, S. ; Koch, E. S. ; Heeg, K. ; Wagner, H. Eur. J. , Immunol. 27: 3420 (1997) ; Sparwasser, T. ; Koch, E. S. ; Vabulas, R. M. ; Lipford, G. B. ; Heeg, K. ; Ellart, J. W. ; Wagner, H. , Eur. J. Immunol. 28: 2045 (1998) ; およびZhao, Q. ; Temsamani, J. ; Zhou, R. Z. ; Agrawal, S. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 495 (1997) を参照）。

【0010】

抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗菌剤および抗炎症剤、ならびに免疫治療におけるアジュバントとしてのCpG-PS-オリゴの使用が、報告されている（例えば、Dunford, P. J. ; Mulqueen, M. J. ; Agrawal, S. Antisense 97: Targeting the Molecular Basis of Disease, (Nature Biotechnology) Conference abstract, 1997, pp 40 ; Agrawal, S. ; Kandimalla E. R. Mol. Med. Today 6: 72 (2000) ; Chu, R. S. ; Targoni, O. S. ; Krieg, A. M. ; Lehmann,

P. V. ; Harding, C. V. J. Exp. Med. 186 : 1623 (1997) ; Zimmermann, S. ; Egeter, O. ; Hausmann, S. ; Lipford, G. B. ; Rocken, M. ; Wagner, H. ; Heeg, K. J. Immunol. 160 : 3627 (1998) を参照)。

【0011】

Moldoveanu et al., Vaccine 16 : 1216-124 (1998) には、CpG含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を増強するということが教示されている。McCluskie and Davis, J. Immunol. 161 : 4463-4466 (1998) には、CpG含有オリゴヌクレオチドが、B型肝炎表面抗原に対する免疫応答を増強する強力なアジュバントとして作用することが教示されている。

【0012】

Zhao, Q. ; Temsamani, J. ; Idarola, P. ; Jiang, Z. ; Agrawal, S. Biochem. Pharmacol. 51 : 173 (1996) には、CpGモチーフにおけるデオキシヌクレオシドを2'-O-メチルリボヌクレオシドに置換することは、免疫刺激活性を抑制することが教示されており、2'-O-メチル修飾より誘導された強固なC3'-エンド (endo) 型コンホメーションにより、免疫刺激経路に関与するタンパク質とCpGモチーフの適切な認識および/または相互作用がなされないことが示唆されている。さらに、この文献には、CpGモチーフのCとG間におけるリン酸基の非架橋性酸素に対するメチル基の置換が、免疫刺激活性を抑制することが教示されており、リン酸基の負電荷がタンパク質認識および相互作用のために不可欠であるということが示唆されている。

【0013】

Zhao, Q. ; Yu, D. ; Agrawal, S. Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 : 3453 (1999) には、5'-側で、CpGモチーフに隣接する1つまたは2つの2'-デオキシヌクレオシド

を2'-または3'-O-メチルリボヌクレオシドに置換することは、免疫刺激活性の減衰を引き起こすが、同じ置換がCpG-モチーフの3'-側でなされる場合は、それは微々たる影響しか有さないことが教示されている。しかし、Zhao, Q.; Yu, D.; Agrawal, S. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10: 1051 (2000)には、5'-側のCpG-モチーフから2または3ヌクレオシド離れているデオキシヌクレオシドを1つまたは2つの2'-O-メトキシエチルまたは2'-若しくは3'-O-メチルリボヌクレオシドに置換することが、免疫刺激活性の著しい増強をもたらすことが教示されている。

【0014】

免疫刺激の原因となる、タンパク質／レセプター因子の認識に必要なCpG-モチーフの正確な構造条件および特有の官能基は、未だ詳細には研究されていない。したがって、効果的な免疫刺激活性を与える新規な免疫刺激モチーフが必要である。

【0015】

発明の概要

本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物による免疫応答を増強するための方法を提供する。本発明による方法は、免疫治療用途における免疫刺激効果を増大させること可能にする。したがって、本発明は、さらに、このようなオリゴヌクレオチド化合物を製造し、使用するための方法を提供する。

本発明者らは、驚くべきことに、免疫刺激オリゴヌクレオチドの位置的修飾が、これらの免疫刺激能力に劇的に影響することを見出した。特に、免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインにおける修飾は、免疫刺激効果を、再現可能かつ予測可能な方法で増強する。

【0016】

第1の側面において、本発明は、免疫刺激ドメインおよび随意的に、1つまたは2つ以上の増強ドメインを含む免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を提供する。いくつかの態様において、免疫刺激ドメインは、非天然に生ずるピリミジン塩基を含んでいるジヌクレオチドアナログを含む。いくつかの態様において、免疫刺

激ドメインおよび／または増強ドメインは、以下に記載されるように、特定の位置に免疫刺激部分を含む。いくつかの態様において、免疫刺激オリゴヌクレオチドは、3' - 3' 結合を含む。一態様において、そのような3' - 3' 結合のオリゴヌクレオチドは、2つのアクセス可能な (a c c e s s i b l e) 5' - 末端を有する。

【0017】

第2の側面において、本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法を提供する。いくつかの態様において、本方法は、免疫刺激ドメインに非天然に生ずるピリミジン塩基を含むジヌクレオチドアナログを導入することを含む。いくつかの態様において、本方法は、以下に記載されるように特定の位置で、免疫刺激部分を免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインに導入することを含む。いくつかの態様において、本方法は、3' - 3' 結合をオリゴヌクレオチドに導入することを含む。

【0018】

第3の側面において、本発明は、患者に免疫応答を引き起こすための方法であって、本発明による免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。

【0019】

第4の側面において、本発明は、病原体による疾患を有する患者を治療的に処置するための方法であって、本発明による免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。

【0020】

第5の側面において、本発明は、癌患者を処置するための方法であって、本発明による免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。

【0021】

第6の側面において、本発明は、自己免疫性の喘息などの自己免疫疾患を処置するための方法であって、本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面で

記載したように実施する。

【0022】

第7の側面において、本発明は、気道炎症またはアレルギーを処置するための方法であって、本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面で記載したように実施する。

【0023】

詳細な説明

本発明は、免疫治療用途における免疫刺激剤としてのオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの治療的な使用に関する。本明細書中で引用した特許および刊行物は、当該分野における知識のレベルを反映し、これらの全体が、参照により本出願中に組み込まれる。本明細書中に引用した任意の参考文献の任意の教示と本明細書との間に矛盾がある場合には、本発明に関しては、後者が優勢でなければならない。

【0024】

本発明は、免疫治療用途における免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物による免疫応答を増強するための方法を提供する。したがって、本発明は、さらに、免疫治療のための最適レベルの免疫刺激効果を有する化合物、並びにそのようなオリゴヌクレオチド化合物を製造し、使用するための方法を提供する。

【0025】

本発明者らは、驚くべきことに、免疫刺激オリゴヌクレオチドに導入された位置的化学修飾が、これらの免疫刺激能力に劇的に影響することを見出した。特に、免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインにおける修飾は、免疫刺激効果を、所望の用途に対して再現可能な様式で増強することができる。

【0026】

第1の側面において、本発明は、免疫刺激ドメインおよび随意的に、1つまたは2つ以上の増強ドメインを含む免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を提供する。ある好ましい態様において、免疫刺激ドメインは、非天然ピリミジンヌクレオシドを含んでいるジヌクレオチドアナログを含む。

【0027】

本発明の全ての側面に関して、用語「オリゴヌクレオチド」は、2または3以上のデオキシリボヌクレオシドのポリマー、または2'-若しくは3'-置換ヌクレオシド、2'-若しくは3'-O-置換リボヌクレオシド、デアザヌクレオシドまたはこれらの任意の組み合わせを含む、任意の修飾されたヌクレオシドのポリマーを含む。このようなモノマーは、互いに、既知の種々のヌクレオシド間結合のいずれかにより結合させることができる。ある好ましい態様において、これらのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートまたはホスホラミデート結合であってもよく、前記の任意の3'-5'、2'-5'、3'-3' および5'-5' 結合またはこれらの組み合わせを含む。

【0028】

用語オリゴヌクレオチドはまた、化学的に修飾された塩基または糖を有し、および/または、限定せずに親油性基、挿入剤、ジアミンおよびアダマンタンを含む、追加の置換基を有するようなポリマーを包含する。用語オリゴヌクレオチドはまた、以下でさらに記載されるように、ペプチド核酸（PNA）、リン酸基を有するペプチド核酸（PHONA）、ロック（locked）核酸（LNA）、モルホリノ核酸並びに非ペントース糖（例えばヘキソース）またはアベーシック（abasic）糖のバックボーン若しくはバックボーン部分を含むオリゴヌクレオチドおよびノンシュガーリンカー若しくはスペーサー基を有するバックボーン部分を含むオリゴヌクレオチドを包含する。

【0029】

本発明に関して、用語「2'-置換」および「3'-置換」は、（それぞれ）ペントース部分の2'（または3'）位置のハロゲン（好ましくはCl、BrまたはF）、または1～6個の飽和若しくは不飽和炭素原子を含有する-O-低級アルキル基での、あるいは2～6個の炭素原子を有する-O-アリールまたはアリル基での置換を意味し、ここで、このようなアルキル、アリールまたはアリル基は、非置換であってもよく、または、例えば、ハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボニル、カ

ルバルコキシまたはアミノ基で置換されてもよく；または、このような2'置換は、水酸基（リボヌクレオシドを生成するため）またはアミノ基によるものでもよいが、2'（または3'）H基によるものではない。

【0030】

本発明に関して、用語「免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物」は、それがなければ該化合物が免疫刺激効果を有さないであろう、免疫刺激ジヌクレオチドを含む化合物を意味する。「免疫刺激ジヌクレオチド」は、式5'-ピリミジン-プリン-3'、式中、「ピリミジン」は、天然または非天然ピリミジンヌクレオシドであり、および「プリン」は、天然または非天然プリンヌクレオシドである、を有するジヌクレオチドである。このような免疫刺激ジヌクレオチドの1種は、CpGである。

【0031】

用語「CpG」または「CpGジヌクレオチド」は、ジヌクレオチド5'-デオキシシチジン-デオキシグアノシン-3'を意味し、ここで、pは、ヌクレオチド間結合であり、好ましくは、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートから選択される。

【0032】

本発明に関して、用語「ジヌクレオチドアナログ」は、上記の免疫刺激ジヌクレオチドであり、ここで、ピリミジンおよびプリンヌクレオシドの一方または両方は、非天然ヌクレオシドである。「非天然」ヌクレオシドは、非天然に生ずる塩基および／または非天然に生ずる糖部分を含有するものである。

【0033】

本発明に関して、塩基は、それがチミン、グアニン、シトシン、アデニンおよびウラシルからなる群から選択されない場合、非天然とみなされる。用語「C* pG」および「CpG*」は、各々、シチジンアナログ（非天然ピリミジンヌクレオシド）またはグアノシンアナログ（非天然プリンヌクレオシド）を含む免疫刺激ジヌクレオチドアナログを示す。

【0034】

図27は、CpGモチーフの化学構造を示しており、シトシンの水素結合受容

基および水素結合供与基として作用する官能基を示している。シトシンは、2つの水素結合受容基を位置2（ケト酸素）および位置3（窒素）に、および水素結合供与基を位置4（アミノ基）に有する。これらの基は、免疫刺激を担うレセプターとの、潜在的な認識および相互作用基として働くことができる。

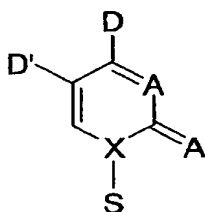
【0035】

図28は、天然シトシンと同型構造であり、5-メチルデオキシシトシン（2）、5-メチルデオキシイソシトシン（3）、5-ヒドロキシーデオキシシトシン（4）、デオキシウリジン（5）、N4-エチルデオキシシトシン（6）およびデオキシ-P-塩基（7）を含むシトシンアナログを示す。

【0036】

したがって、一態様において、免疫刺激ジヌクレオチドは、構造（I）：

【化3】



（I）

【0037】

（I）において、Dは、水素結合供与体であり、D'は、水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子吸引基および電子供与基からなる群から選択され、Aは、水素結合受容体であり、Xは、炭素または窒素であり、およびSは、ピリミジン塩基に連結されたペントースまたはヘキソース糖環である、で表されるピリミジンヌクレオシドを含むいくつかの態様において、ピリミジンヌクレオシドは、非天然ピリミジンヌクレオシドであり、すなわち、構造（I）で表される化合物は、シチジンまたはデオキシシチジンではない。

【0038】

いくつかの態様において、（I）の塩基部分は、非天然に生ずるピリミジン塩基である。好ましい非天然に生ずるピリミジン塩基の例は、限定されることなく、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、N4-アルキルシト

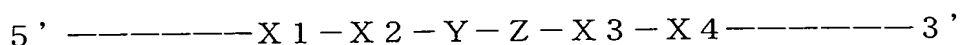
シン、好ましくは、N4-エチルシトシンおよび4-チオウラシルを含む。

【0039】

いくつかの態様において、(I)の糖部分Sは、非天然に生ずる糖部分である。本発明に関して、「天然に生ずる糖部分」は、リボースまたは2'-デオキシリボースであり、そして「非天然に生ずる糖部分」は、ヌクレオチドにおけるバックボーンに用いることができる、リボースまたは2'-デオキシリボース以外のいずれかの糖である。アラビノースおよびアラビノース誘導体は、好ましい非天然に生ずる糖部分の例である。

【0040】

本発明による免疫刺激ドメインは、免疫刺激天然ジヌクレオチドまたは非天然ジヌクレオチドアナログの片側あるいは両側の免疫刺激部分を含んでもよい。例えば、免疫刺激ドメインは、以下のように描写されてもよく、



ここで、Yは、シチジンまたは非天然ピリミジンヌクレオシドアナログを示し、Zは、グアノシンまたは非天然プリンヌクレオシドアナログを示し、および各Xは、独立して、本発明によるヌクレオシドまたは免疫刺激部分を示す。

【0041】

「免疫刺激部分」は、免疫刺激部分を欠くものより高免疫刺激性の免疫刺激オリゴヌクレオチドをもたらす、免疫刺激ドメインまたは増強ドメイン中の特定の位置における化学構造である。

【0042】

好ましい免疫刺激部分は、限定されることなく、メチルホスホネート、メチルホスホノチオエート、ホスホトリエステル、ホスホチオトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、トリエステルプロドラッグ、スルホン、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、N-メチルヒドロキシルアミン、カルボネート、カルバメート、ボラノホスホネート、ホスホラミデート、特に、一級アミノホスホラミデート、N3-ホスホラミデートおよびN5-ホスホラミデート、並びに立体特異的な結合（例えば、(R)-または(S)-ホスホロチオエート、アルキルホスホネートまたはホスホトリエステル結合）を含む、

リン酸バックボーンにおける修飾を含む。

【0043】

本発明による好ましい免疫刺激部分は、さらに、限定されることなく、2'-O-メチルリボース、2'-O-メトキシエチルリボース、2'-O-プロパルギルリボースおよび2'-デオキシ-2'-フルオロリボースを含む2'-置換ペントース糖；限定されることなく、3'-O-メチルリボースを含む3'-置換ペントース糖；1', 2'-ジデオキシリボース；限定されることなく、アラビノース、1'-メチルアラビノース、3'-ヒドロキシメチルアラビノース、4'-ヒドロキシメチルアラビノースおよび2'-置換アラビノースを含むヘキソース糖；並びに α -アノマーを、限定されることなく含む糖修飾を有するヌクレオシドを含む。

【0044】

本発明による好ましい免疫刺激部分は、他の炭水化物バックボーン修飾および置換を有し、ペプチド核酸（PNA）、リン酸基を有するペプチド核酸（PHONA）、ロック核酸（LNA）、モルホリノ核酸を含むオリゴヌクレオチド、およびアルキルリンカーまたはアミノリンカーを有するバックボーン部分を有するオリゴヌクレオチドをさらに含む。

【0045】

アルキルリンカーは、分枝状または非分枝状であってもよく、置換されていてもまたは非置換であってもよく、および光学的に純粋であってもまたはラセミ混合物でもよい。最も好ましくは、約2～約18個の炭素原子を有するこのようなアルキルリンカーである。

【0046】

いくつかの好ましい態様において、このようなアルキルリンカーは、約3～約9個の炭素原子を有する。このようなアルキルリンカーは、ポリエチレングリコールリンカー $[-O-CH_2-CH_2-]_n$ ($n=2\sim9$) を含む。いくつかの好ましい態様において、このようなアルキルリンカーは、ペプチドまたはアミノ酸を含んでもよい。

【0047】

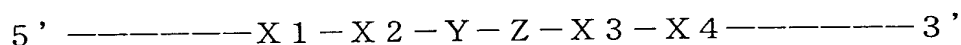
本発明による好ましい免疫刺激部分は、さらに、限定されることなく、 β -L-デオキシヌクレオシドおよび α -デオキシヌクレオシドを含むDNAアイソフォームを含む。本発明による好ましい免疫刺激部分は、さらに、限定されることなく、2'-5'、2'-2'、3'-3' および5'-5' 結合を含む、非天然なヌクレオシド間結合位置を有するヌクレオシドを含む。

【0048】

本発明による好ましい免疫刺激部分は、さらに、限定されることなく、5-ヒドロキシデオキシシチジン、5-ヒドロキシメチルデオキシシチジン、N4-アルキルデオキシシチジン、好ましくは、N4-エチルデオキシシチジン、4-チオウリジン、6-チオデオキシグアノシン、7-デアザグアノシンおよびニトロピロールのデオキシリボヌクレオシド、C5-プロピニルピリミジン、および限定されることなく、2, 6-ジアミノプリンを含むジアミノプリンを含む、修飾された複素環式の塩基を有するヌクレオシドを含む。

【0049】

具体的な説明のために、そして限定することを目的とせずに、例えば、前記の免疫刺激ドメインにおいて、



位置X3またはX4のヌクレオシドメチルホスホネートは免疫刺激部分であり、位置X1の置換または非置換アルキルリンカーは、免疫刺激部分であり、そして位置X1の β -L-デオキシヌクレオシドは、免疫刺激部分である。免疫刺激ドメイン中の免疫刺激部分の代表的な位置および構造については、以下の表1を参照。

【0050】

【表1】

表 1

位置	代表的な免疫刺激部分
X 1	C 3 - アルキルリンカー、2 - アミノブチル - 1, 3 - プロパンジオールリンカー (アミノリンカー)、 β - L - デオキシヌクレオシド
X 2	2 - アミノブチル - 1, 3 - プロパンジオールリンカー
X 3	ヌクレオシドメチルホスホネート
X 4	ヌクレオシドメチルホスホネート、2' - O - メチル - リボヌクレオシド

【0051】

いくつかの態様において、免疫刺激オリゴヌクレオチドは、さらに、増強ドメインを含む。

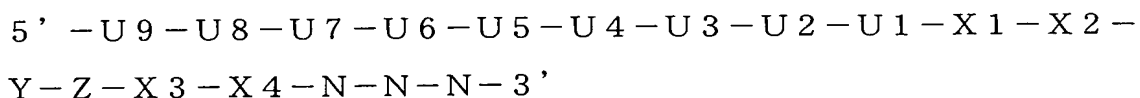
「増強ドメイン」は、増強ドメインを含有する場合に、増強ドメインを欠くオリゴヌクレオチドより高免疫刺激性のオリゴヌクレオチドをもたらす、免疫刺激ドメイン以外の免疫刺激オリゴヌクレオチドアナログの領域である。

【0052】

増強ドメインは、免疫刺激ドメインに対して上流または下流であることができる。用語「上流」は、免疫刺激ジヌクレオチドまたはジヌクレオチドアナログ (Y - Z) の 5' 側の位置を示すために用いられる。用語「下流」は、Y - Z の 3' 側の位置を示すために用いられる。

【0053】

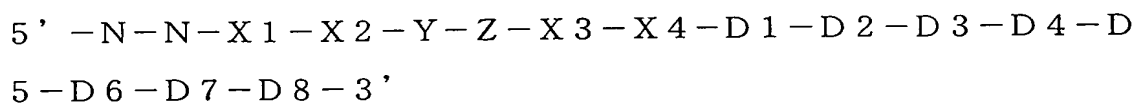
例えば、免疫刺激オリゴヌクレオチドアナログは、構造



を有してもよく、ここで、U9 ~ U1 は、上流増強ドメインを示し、ここで、各 U は、独立して、同一または異なるヌクレオシド免疫刺激部分を示し、N は、任意のヌクレオシドを示し、および X1 ~ X4、Y および Z は、前記と同様である。

【0054】

代替的に、免疫刺激オリゴヌクレオチドアナログは、構造



を有してもよく、ここで、D1～D8は、下流増強ドメインを示し、ここで、各Dは、独立して、同一または異なるヌクレオシドまたは免疫刺激部分を示し、および他の記号の全ては、上記と同様である。

【0055】

これらの構成において、U6の免疫刺激部分は、免疫刺激ジヌクレオチドまたはジヌクレオチドアナログから6位置上流であり、およびD4の免疫刺激部分は、免疫刺激ジヌクレオチドまたはジヌクレオチドアナログから4位置下流である。

【0056】

任意のUまたはD位置は、ヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログであるか、またはそうでなくてもよい免疫刺激部分を示すことができるため、ヌクレオシドよりむしろ用語「位置」が用いられる。当然ながら、上流および下流増強ドメインの両方を有するオリゴヌクレオチドアナログは構築可能である。

【0057】

表2は、上流増強ドメインを有する免疫刺激オリゴヌクレオチド中の免疫刺激部分の代表的な位置と構造を示す。表2および3に記載のスペーサー9およびスペーサー18の定義については、図7を参照。

【表2】

表 2

位置	代表的な免疫刺激部分
X 2	2-アミノブチル-1,3-プロパンジオールリンカー
X 1	C3-リンカー、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオールリンカー、 β -L-デオキシヌクレオシド
U 1	1',2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、2'-O-メチル-リボヌクレオシド
U 2	1',2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スパーサー18、3'-デオキシヌクレオシド、ヌクレオシドメチルホスホネート、 β -L-デオキシヌクレオシド、2'-O-プロパルギル-リボヌクレオシド
U 3	1',2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スパーサー9、スパーサー18、ヌクレオシドメチルホスホネート、2'-5' 結合
U 2 + U 3	1',2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、 β -L-デオキシヌクレオシド
U 3 + U 4	ヌクレオシドメチルホスホネート、2'-O-メトキシエチル-リボヌクレオシド
U 5 + U 6	1',2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー
X 1 + U 3	1',2'-ジデオキシリボース

【0058】

表3は、下流増強ドメインを有する免疫刺激オリゴヌクレオチド中の免疫刺激部分の代表的な位置と構造を示す。

【表3】

表 3

位置	代表的な免疫刺激部分
X 3	ヌクレオシドメチルホスホネート
X 4	ヌクレオシドメチルホスホネート、2' - O - メチル ーリボヌクレオシド
D 1	1' , 2' - ジデオキシリボース、ヌクレオシドメチ ルホスホネート
D 2	1' , 2' - ジデオキシリボース、C 3 - リンカー、 スパーサー 9、スパーサー 18、2 - アミノブチル 1,3 - プロパンジオールリンカー、ヌクレオシドメ チルホスホネート、 β - L - デオキシヌクレオシド
D 3	3' - デオキシヌクレオシド、2' - O - プロパルギ ルーリボヌクレオシド、2' - 5' 結合
D 2 + D 3	1' , 2' - ジデオキシリボース、 β - L - デオキシ ヌクレオシド

【0059】

本発明の別の態様において、本発明によるオリゴヌクレオチドは、1つまたは2つのアクセス可能な5'末端を有する。本発明者らは、免疫刺激ジヌクレオチドに対し5'領域での免疫刺激部分は、免疫刺激ジヌクレオチドに対し3'領域での同様の置換よりも免疫刺激活性に対する影響が増大であることを見出した。

【0060】

この観察は、CpG-PS-オリゴの5'-フランキング領域は、免疫刺激活性において、重要な役割を果たすことを示唆する。さらに、本発明者らは、3'-5'または3'-3'結合を介して連結した2つのオリゴヌクレオチドユニットを有する化合物は、5'-5'結合を介して連結した2つのオリゴヌクレオチドユニットの化合物より高い免疫刺激活性を有することを見出した。

【0061】

したがって、いくつかの好ましい態様において、本発明による免疫刺激オリゴヌクレオチドは、3'-3'結合を含む。いくつかのそのような態様において、オ

リボヌクレオチドは、1つまたは2つのアクセス可能な5'末端を有する。

【0062】

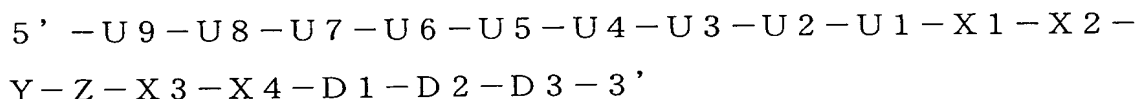
第2の側面において、本発明は、免疫刺激オリボヌクレオチドの免疫刺激効果を調節するための方法を提供する。いくつかの態様において、本方法は、本発明の第一の側面で記載したように、免疫刺激ドメインに非天然に生ずるピリミジン塩基を含むジヌクレオチドアナログを導入することを含む。

【0063】

いくつかの態様において、本方法は、上記のように、特定の位置で免疫刺激部分を免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインに導入することを含む。いくつかの態様において、本方法は、3'-3'結合をオリボヌクレオチドに導入することを含む。

【0064】

本発明に関して、特定の位置で、「免疫刺激部分を導入すること」は、単に、特定された位置で免疫刺激部分を有するオリボヌクレオチドを合成することを意味する。例えば、「位置U6に免疫刺激部分を導入すること」は、単に、例えば以下の構造



を参照し、そのような位置で免疫刺激部分を有するオリボヌクレオチドを合成することを意味する。

【0065】

好ましくは、本発明のこの側面による方法は、表1～3に記載した好ましい置換パターンによる免疫刺激ドメインまたは上流若しくは下流増強ドメインの位置で、免疫刺激部分を導入することを含む。

【0066】

本発明のこの側面による方法は、単に、所望の位置を得るための適切なサイクル中における合成方法において、適切な免疫刺激部分のモノマーシントンを用いることにより、よく知られた合成手法のいずれかを用いて、好都合に実施することができる。

【0067】

好ましいモノマーは、ホスホラミダイト、ホスホトリエステルおよびH-ホスホネートを含む。PS-オリゴは、簡易に、例えば、適切なホスホラミダイトを用いるCPG-固体担体で、 β -シアノエチルホスホラミダイト化学を用いて合成し、必要に応じて、脱保護し、C₁₈逆相HPLCにより精製し、蒸留水に対して透析し、および凍結乾燥する。各PS-オリゴの純度は、簡易に、CGEにより測定され、そして分子量は、MALDI-TOFマスペクトル分析により確認できる。

【0068】

第3の側面において、本発明は、患者の免疫応答を引き起こすための方法であって、本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む方法を提供する。

【0069】

本発明のこの側面による方法において、好ましくは、化合物の投与は、非経口、経口、舌下、経皮的、局所的、鼻腔内、気管内、腔内または直腸内である。治療組成物の投与は、既知の手順を用いて、疾患の症状または代用のマーカーを減少させるのに有効な投与量および期間で実施することができる。全身的に投与する場合、治療組成物を、好ましくは、約0.001マイクロモル～約10マイクロモルのオリゴヌクレオチドの血中レベルを達成するのに十分な投与量で投与する。

【0070】

局所的投与において、これよりもはるかに低い濃度が有効であり得、およびはるかに高い濃度が耐容され得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドの合計投与量は、患者あたり1日約0.1mgのオリゴヌクレオチド～体重1kgあたり1日約40mgのオリゴヌクレオチドの範囲内であろう。治療に有効な量の1種または2種以上の本発明の治療組成物を、同時にまたは逐次的に、個体に、単一の処置エピソードとして投与することが望ましいだろう。

【0071】

いくつかの例において、上記定義より低い投与量でも効果を与え得る。好ましい

態様において、対象となる組成物を投与した後に、補体の活性化、有糸分裂の誘導およびトロンビン血餅形成の阻害からなる群から選択された生物学的効果の1または2以上の測定を行う。

【0072】

ある好ましい態様において、本発明による化合物を、抗生物質、抗原、アレルゲン、ワクチン、抗体、細胞毒性剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、遺伝子療法ベクター、DNAワクチンおよび／またはアジュバントと組み合わせて投与して、免疫応答の特異性または規模を増大する。化合物若しくはワクチンのいずれか、または両方を、随意に、キーホールリンペットヘモシアニン、コレラ毒素Bサブユニットなどの免疫原性タンパク質または任意の他の免疫原性担体タンパク質に結合させることができる。限定されることなく、完全フロイントアジュバント、モノホスホリル脂質A (MPL)、QS-21を含むサポニン、ミョウバンおよびこれらの組み合わせを含む、多くの任意のアジュバントを用いてもよい。

【0073】

本発明による方法の、ある好ましい態様は、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の投与により、サイトカインを誘導する。ある好ましい態様において、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を、抗原、ハプテンまたはワクチンに結合させる。上記のように、本発明者らは、アクセス可能な5'-末端が、ある免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の活性に非常に重要であることを見出した。したがって、最適の免疫刺激活性のために、オリゴヌクレオチドを、好ましくは、オリゴヌクレオチド化合物の3'-末端によって、抗原またはワクチンに結合させる。

【0074】

この側面に関して、「組み合わせて」は、同一の患者において、同一の疾患を処置する経過において、を意味し、オリゴヌクレオチドおよび／またはワクチンおよび／またはアジュバントを、同時投与および数日間隔までの時間的に離間した順序を含む任意の順序で投与することを含む。

【0075】

このような組み合わせ処置はまた、オリゴヌクレオチドおよび／または独立してワクチンおよび／または独立してアジュバントの一回より多い投与を含んでもよ

い。オリゴヌクレオチドおよび／またはワクチンおよび／またはアジュバントの投与は、同一または異なる経路からであってもよい。

本発明のこの側面による方法は、免疫系のモデル研究のために有用であり、さらにヒトまたは動物疾患の治療的処置に有用である。

【0076】

第4の側面において、本発明は、病原体による疾患を有する患者を治療的に処置するための方法であって、患者に本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面における記載のように実施する。

【0077】

第5の側面において、本発明は、癌患者を処置するための方法であって、患者に本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面における記載のように実施する。

【0078】

第6の側面において、本発明は、自己免疫性の喘息などの自己免疫疾患を処置するための方法であって、患者に本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面における記載のように実施する。

【0079】

第7の側面において、本発明は、気道炎症またはアレルギーを処置するための方法であって、患者に本発明によるオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を投与することを含む方法を提供する。投与は、本発明の第3の側面における記載のように実施する。

【0080】

以下の例は、本発明のある好ましい態様をさらに説明することを意図するものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0081】

例

例1：免疫調節部分を含むオリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドを、自動DNA合成装置 (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems, Foster City, CA) を用いて、1マイクロモル規模で合成した。標準的なデオキシヌクレオシドホスホラミダイトは、PerSeptive Biosystemsから得た。

1', 2'-ジデオキシリボースホスホラミダイト、プロピル-1-ホスホラミダイト、2'-デオキシ-5-ニトロインドール-リボフラノシルホスホラミダイト、2'-デオキシ-ウリジン-ホスホラミダイト、2'-デオキシ-Pホスホラミダイト、2'-デオキシ-2-アミノプリンホスホラミダイト、2'-デオキシ-ネブラリンホスホラミダイト、

【0082】

2'-デオキシ-7-デアザグアノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-4-チオウリジンホスホラミダイト、2'-デオキシ-イソグアノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-5-メチルイソシトシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-4-チオチミジンホスホラミダイト、2'-デオキシ-Kホスホラミダイト、2'-デオキシ-2-アミノアデノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-N4-エチル-シトシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-6-チオグアノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-7-デアザーキサントシンホスホラミダイト、

【0083】

2'-デオキシ-8-プロモグアノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-8-オキソグアノシンホスホラミダイト、2'-デオキシ-5-ヒドロキシシトシンホスホラミダイト、アラビノーシトシンホスホラミダイトおよび2'-デオキシ-5-プロピンシトシンホスホラミダイトは、Glen Research (Sterling, VA) から得た。2'-デオキシ-イノシンホスホラミダイトは、ChemGenes (Ashland, MA) から得た。

【0084】

通常のカップリングサイクルまたはホスホラミダイト製造業者により推奨されるカップリングサイクルを、全てのホスホラミダイトに用いた。ホスホロチオエート修飾を得るために、ビューケージ (Beaucage) 試薬をオキシダントと

して用いた。合成後、オリゴヌクレオチドを、CPG-結合オリゴヌクレオチドを濃縮水酸化アンモニウムとともに、室温で1.5～2時間インキュベートし、次いで、水酸化アンモニウム上清を55℃で12時間インキュベートし、またはホスホラミダイト製造業者により推奨されるようにして、脱保護した。

【0085】

水酸化アンモニウム溶液を、speed-vacにおいて蒸発乾固し、5'-DMTr-オリゴヌクレオチドをC18逆相マトリックスにおけるHPLCにより、0.1M酢酸アンモニウムおよび1:5比率のアセトニトリル中の0.1M酢酸アンモニウムの溶媒系を用いて精製した。次いで、オリゴヌクレオチドを、80%酢酸で処理して、DMTr基を除去し、ナトリウム形態に転化し、2回蒸留水に対して透析することにより脱塩した。オリゴヌクレオチドを、0.4μmフィルターに通してろ過し、凍結乾燥し、および2回蒸留水に再溶解した。特性評価は、変性PAGEおよびMALDI-TOF質量分析法により達成した。

【0086】

例2：シトシンアナログを含有するCpG-PS-オリゴの合成

例1で概説された手順に従って、以下のオリゴヌクレオチドが合成された。

【表4】

【表4】

オリゴ#	配列(5' → 3')および修飾 ^a
1	d(CTATCTGAC <u>G</u> TTCTCTGT)
2	d(CTATCTGAC* <u>G</u> TTCTCTGT)
3	d(CTATCTGAC <u>C</u> *TTCTCTGT)
4	d(CTATCTGAC* <u>G</u> TTCTCTGT)
5	d(CTATCTGAC <u>C</u> *TTCTCTGT)

^a CpG-モチーフは、下線で示されている。C*は、5-ヒドロキシシトシン（オリゴ2および3）またはN4-エチルシトシン（オリゴ4および5）を示す。

【0087】

オリゴヌクレオチドは、CGEおよびMALDI-TOF質量分析法（Bruker Proflex III MALDI-TOF 質量分析計の337 nm N2レーザー）により特性評価した。各オリゴヌクレオチドにおける観察分子量および計算分子量（括弧で示される）は、以下のとおりである：オリゴ1、5704（5704.8）；オリゴ2、5720（5720.8）；オリゴ3、5681（5680.7）；オリゴ4、5733、（5733）；オリゴ5、5694（5693）。

【0088】

例3：処置マウスにおける脾臓重量の分析

メスBALB/cマウス（4～5週齢、19～21g、Charles River, Wilmington, MA）を、本研究に用いた。その動物に商用の食餌および水を制限せずに与えた。その動物に、滅菌PBSに溶解した免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の5または10mg/kg用量を注入した。マウスの一群に、コントロール（PBS）として、PBSのみを与えた。各免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物に対し、4匹の動物を用いた。マウスを72時間後に屠殺し、脾臓を摘出し、重量を測定した。

【0089】

例4：マウスリンパ球増殖アッセイにおける免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の分析

CD-1、BALB/c、C57BL/6マウス（4～8週齢）からの脾臓を、リンパ球源として用いた。ガラススライドのフロストされた末端で、穏やかに細分し、単細胞浮遊液を調製した。次いで、細胞を、RPMI完全培地〔10%ウシ胎児血清（FBS）（56℃で30分間、熱不活化）、50μM 2-メルカプトエタノール、100U/mL ペニシリン、100μg/mL ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン加RPMI培地〕で培養した。次いで、細胞を、最終容積100μLの10⁶細胞/mLの密度で、96ウェルディッシュに播いた。

【0090】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物またはLPS（リポ多糖類）を10 μ LのTE緩衝液（10mM トリス-HCl、pH 7.5、1mM EDTA）中で、細胞培養物に加えた。次いで、細胞を37℃で培養に付した。44時間後、1 μ Ci³H-ウリジン（Amersham, Arlington Heights, IL）を、20 μ LのRPMI培地の培養に加え、細胞を、さらに4時間、パルスラベルした。細胞を自動細胞採取装置（Skatron, Sterling, VA）により採取し、フィルターをシンチレーションカウンターで計測した。実験は、3回実施した。

【0091】

例5：シトシンアナログを含有するCpG-PS-オリゴのリンパ球増殖活性
CpG-PS-オリゴ1～5（例4）の免疫刺激活性を、BALB/cマウスリンパ球増殖アッセイを用いて研究した。すなわち、マウス脾臓細胞を培養し、0.1、0.3、1.0および3.0 μ g/mLの濃度のCpG-PS-オリゴとともに48時間インキュベートし、そして細胞増殖を³H-ウリジンの取り込みにより測定した。

【0092】

図23は、マウスリンパ球培養におけるオリゴ1～5の用量依存的細胞増殖活性を示す。用量3.0 μ g/mLで、天然シチジンを有するオリゴ1は、増殖率29.5 \pm 2.1を示した。CpG-モチーフのデオキシシチジンのシトシン塩基が5-ヒドロキシシトシンで置換されているオリゴ2もまた、用量依存的リンパ球増殖を示した。オリゴ2においては、用量3.0 μ g/mLで、増殖率23.7 \pm 2.9が観察された。

【0093】

CpG-モチーフにおいて、シトシン塩基の代わりにN4-エチルーシトシンを含有するPS-オリゴ4もまた、用量依存的細胞増殖活性を示した。オリゴ4において、用量3.0 μ g/mLで観察された増殖率18.7 \pm 1.6は、CpG-モチーフにおけるシトシンの4-アミノ基に対するかさ高い疎水性置換の存在が、免疫刺激活性を若干妨げることを示唆する。

【0094】

CpG-モチーフのデオキシシチジン位置の代わりにデオキシグアノシン位置で5-ヒドロキシーデオキシシチジンが置換されているオリゴ3は、培地コントロールにおいて観察されたのと同様の増殖率を示した(図23)。同様に、CpG-モチーフのデオキシグアノシンがN4-エチルデオキシシチジンで置換されているコントロールオリゴ5は、培地コントロールと同様の細胞増殖を示した。

【0095】

CpG-モチーフのシトシン塩基が、5-メチルデオキシシトシン(2;図28参照)、5-メチルデオキシイソシトシン(3)、デオキシウリジン(5)またはデオキシーP-塩基(7)で置換されている他のオリゴは、同様のアクセスシステムにおいて、細胞増殖活性がないか、またはわずかな細胞増殖活性しか示さなかった。

【0096】

これらの結果は、(i) CpG-モチーフのシトシン塩基が5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシンで置換されている場合(それぞれオリゴ2および4)には、細胞増殖活性は維持されるが、(ii) グアニン塩基をこれらのシトシンアナログに置換することは、細胞増殖活性の損失をもたらすことを示唆するものである。

【0097】

例6: シトシンアナログを含有するCpG-PS-オリゴにより誘導されたマウスの脾種

CpG-PS-オリゴのインビトロでの効果を確認するために、オリゴ1、2および4(例4から)を、用量10mg/kgで、BALB/cマウスに腹腔内(ip)注入し、各PS-オリゴの免疫刺激活性のレベルの指標として脾臓重量の変化を測定した。CpG-PS-オリゴで処置した結果としての脾臓重量の変化を、図24に示す。

【0098】

メスBALB/cマウス(4~6週齢、19~21g)を、各グループ4匹のマウスの異なるグループに分割した。オリゴヌクレオチドを滅菌PBSに溶解し、用量10mg/kgで、マウスに腹腔内投与した。72時間後、マウスを屠殺し

て、脾臓を取り出し、重量を測定した。各円は、個々のマウスの脾臓重量を表し、+は、各グループにおける平均脾臓重量を表す。

【0099】

CpG-モチーフに天然デオキシシチジンを有するオリゴ1は、PBSを受けたマウスのコントロールグループと比較し、用量10mg/kgで、脾臓重量の約45%の増加を示した。CpG-モチーフのシトシン塩基の代わりに5-ヒドロキシシトシンを有するオリゴ2は、同じ用量で、脾臓重量の約35%の増加を示した。

【0100】

CpG-モチーフのシトシン塩基の代わりにN4-エチルシトシンを有するオリゴ4は、コントロールグループと比較して、同じ用量で、脾臓重量の約34%の増加を示した。これらのデータは、CpG-モチーフにおいて、デオキシシチジンの代わりに、修飾されたシチジンアナログを含有するこれらのオリゴに対するリンパ球増殖アッセイで観察された結果を確認するものである。

【0101】

例7：C* pG-P S-オリゴの構造活性相関

CpG-モチーフにおいて、シトシンの5-位置でのメチル基の存在（5-メチルデオキシシトシン、2（図28））は、CpG-P S-オリゴのCpGに関する免疫刺激効果を完全になくす。インビトロおよびインビボ実験において観察された結果に基づき、我々は、シトシンアナログを含有するP S-オリゴにおける構造活性相関を構築した。

【0102】

CpG-モチーフにおいて、シトシン塩基（1）の5-メチルイソシトシン（3）での置換は、5-メチルシトシン（2）でのものと同様に免疫刺激活性の完全な喪失をもたらすが、これは、それぞれ2および4-位置のケトおよびアミノ基の入れ替えおよび／またはシトシンの5-位置への、疎水性メチル基の設置の結果であり得る。

【0103】

CpG-モチーフにおいて、シトシンの5-位置での親水性水酸基置換を含有す

るオリゴ2は、天然シトシン塩基を含有するオリゴ1と同様の免疫刺激活性を示した。この観察は、CpG-PS-オリゴの免疫刺激活性に関して、かさ高い親水基は、シトシンの5-位置の疎水基より一層耐容されることを示唆する。おそらく、レセプター上のCpG-オリゴに対する結合ポケットは事実上親水性であり、シトシンの5-位置の疎水基に適合できない。

【0104】

CpG-モチーフにおいて、シトシン塩基を、ケト基が2および4-位置の両方に存在するウラシルと置換する場合（5（図28参照））、免疫刺激活性は観察されず、これは、シトシンの4-位置の水素結合供与性アミノ基が、免疫刺激活性に重要であることを示唆している。

【0105】

CpG-モチーフにおいて、シトシンの4-アミノ基に大型疎水性エチル基を置換する場合、マウスのリンパ球増殖の減少および脾臓重量増加の若干の減少が観察され、これは、この位置でのかさ高いエチル基は、免疫刺激活性を引き起こすレセプター因子へのCpG-PS-オリゴの結合を妨害しないことを示唆するものである。

【0106】

エチル置換にもかかわらず、N4-エチルシトシン（6）の4-アミノ基は、受容体との水素結合形成に関与できる。4-位置に位置する窒素基が5-位置との環状構造形成に関与し、水素結合供与性アミノ基を4-位置に有さない、修飾ピリジン塩基dPは、培養中で、マウスリンパ球増殖活性を有さなかったが、これは、CpG-モチーフにおいて、シトシンの4-アミノ基が免疫刺激活性に重要であることを示唆するものである。

【0107】

結論として、ここで示した結果は、シトシンの2、3および4位置の官能基が、CpG-関連免疫刺激活性に重要であることを示している。シトシンの5-位置での疎水性置換は、完全にCpG-オリゴの免疫刺激活性を抑制するが、この位置の親水基は、十分に耐容される。

【0108】

さらに、CpG-モチーフにおいて、シトシンの代わりに、5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシンを含有するCpG-PS-オリゴの免疫刺激活性は、5'-フランキング配列における適切な化学修飾の組み込みにより有意に調節でき、これは、CpG-モチーフにおいて、これらのシトシンアナログは免疫刺激モチーフの一部として認識されることを示唆している。

【0109】

例8：末端-ブロックCpG-PS-オリゴヌクレオチドの合成

図17で示されるCpG-PS-オリゴは、自動化合成装置およびホスホラミダイト方法を用いて合成した。オリゴ1（16マー（16-mer））は、ヌクレオシド-5'-β-シアノエチルホスホラミダイトを用いて合成した。オリゴ2（32マー）を、ヌクレオシド-3'-β-シアノエチルホスホラミダイトおよびオリゴ1の16マー配列が二度繰り返された3'-結合ヌクレオシドを有するコントロールドポアガラス担体（CPG-固体担体）を用いて合成した；したがって、オリゴ2は、通常の3'-5'結合により連結した2つの16マー（オリゴ1）を有した。

【0110】

オリゴ3（32マー）は、5'-5'結合により連結した2つの16マー（オリゴ1）により合成したため、オリゴ3は、2つの3'-末端を有し、5'-末端は有さない。オリゴ3の合成は、2段階で実施した：第一の16マーを、ヌクレオシド-3'-β-シアノエチルホスホラミダイトおよび3'-結合ヌクレオシドを有する固体担体を用いて合成し、次いで、第二の16マーセグメントの合成を、ヌクレオシド-5'-β-シアノエチルホスホラミダイト用いて継続した。

【0111】

オリゴ4（32マー）は、3'-3'結合により連結した2つの16マー（オリゴ1）を含むため、オリゴ4は、2つの5'-末端を有し、3'-末端は有さない。オリゴ4の合成は、2段階で実施した：第一の16マーを、ヌクレオシド-5'-β-シアノエチルホスホラミダイトおよび5'-結合ヌクレオシドを有する固体担体を用いて合成し、第二の16マーセグメントの合成を、ヌクレオシド-3'-β-シアノエチルホスホラミダイトを用いて継続した。

【0112】

オリゴ5～8の合成は、それぞれ、オリゴ1～4に関するのと、同一のヌクレオシド-β-シアノエチルホスホラミダイトを用いることにより実施した。合成の最後で、オリゴ1～8を、濃縮アンモニア溶液で脱保護し、逆相HPLCにより精製し、脱トリチル化し、脱塩しおよび透析した。各PS-オリゴの純度を、CGEによりチェックし、および分子量をMALDI-TOF質量分析法により確認した(表1)。

【0113】

オリゴ1～8において、5'-CpGモチーフの配列完全性および方向性を、これらのそれぞれのDNA相補鎖(オリゴ1～4については5'-AAGGTCGAGCGTTCTC-3'、オリゴ5～8については5'-ATGGCGCACGCTGGGAGA-3')との二重鎖の融解温度(T_m s)を記録することにより確認した。これらの二重鎖の融解温度は、53.9±0.9℃(オリゴ1～4)、61.8℃(オリゴ5)および58.8±0.6℃(オリゴ6～8)であった(注:オリゴ5は18マーであり、およびオリゴ6～8は、32マーであり、36マーではない)。

【0114】

例9:末端ブロックCpG-PS-オリゴヌクレオチドのマウス脾臓リンパ球増殖活性

リンパ球増殖アッセイにおいて、例8の末端-ブロックCpG-PS-オリゴの免疫刺激活性を、最初に研究した。典型的には、マウス(Balb-C)脾臓リンパ球を、CpG-PS-オリゴとともに濃度0.1、1.0および10.0 μg/mlで48時間培養し、細胞増殖を、例3で記載したように、³H-ウリジンの取り込みにより決定した。結果は図17に示す。

【0115】

オリゴ1は、細胞増殖の用量依存的効果を誘導した;濃度10 μg/ml(～2.0 μM)で、増殖率は5.0±0.32であった。3'-5'結合により連結されたオリゴ1の2つのユニットからなるオリゴ2は、同用量(～1.0 μM)で、5.8±0.28の増殖率を有した。

【0116】

5' - 5' 結合により連結されたオリゴ1の2つのユニットからなるオリゴ3は、 2.0 ± 0.26 の増殖率を有し、これは、オリゴ1および2での観察よりも極めて低い免疫刺激活性であるということを示す。3' - 3' 結合により連結されたオリゴ1の2つのユニットからなるオリゴ4は、 7.2 ± 0.5 の増殖率を有し、これは、オリゴ1および2での観察よりも高い免疫刺激活性であるということを示す。

【0117】

オリゴ5～8でも同様の結果が得られた。オリゴ5は、 3.9 ± 0.12 の増殖率を有した。2ユニットのオリゴ5が、3' - 5' 結合（オリゴ6）、5' - 5' 結合（オリゴ7）および3' - 3' 結合（オリゴ8）により連結したオリゴ6～8は、それぞれ、 4.9 ± 0.2 、 1.74 ± 0.21 および 7.7 ± 0.82 の増殖率を有した。

【0118】

オリゴ6～8で得られた結果の比較は、2つのオリゴ5配列が3' - 5' 結合または3' - 3' 結合により連結したオリゴ6および8は、オリゴ5よりも高い免疫刺激活性を有するが、2つのオリゴ5が5' - 5' 結合により連結したオリゴ7は、オリゴ5よりも極めて低い免疫刺激活性を有することを示す。

オリゴ1～8のリンパ球増殖の結果から、オリゴが5' - 末端を介して連結する場合、免疫刺激活性の大きな損失となるが、それらが3' - 末端を介して連結する場合、免疫刺激活性の増大になることは明白である。

【0119】

3' - 3' 結合のオリゴは、同様に増大した免疫刺激活性をもたらすフリーな3' - 末端を含有するオリゴよりも、実質的に、エキソヌクレアーゼによる分解に対し十分な安定性を示したことに注目することは重要である。オリゴの5' - 末端がブロックされたオリゴ3および7の低い免疫刺激活性は、オリゴの5' - 末端へのアクセス性がCpG-PS-オリゴの免疫刺激活性に不可欠であることを示唆している。

【0120】

例10：末端ブロックCpG-PS-オリゴヌクレオチドにより誘導されたマウスの脾腫

オリゴ1～8（例8）のインビボでの免疫刺激活性を確認するために、用量5mg/kgのオリゴヌクレオチドを、BALB/cマウスに腹腔内注入した。投与72時間後にマウスを屠殺し、脾臓を取り除き、乾燥のためにプロットし、重量を測定した。処置されたマウスと処置されていないマウスの脾臓重量変化を免疫刺激活性のパラメータとして使用した。

【0121】

5mg/kgの用量のオリゴ1の投与は、PBSを与えられたコントロールマウスと比較して、脾臓重量の約40%の増加を引き起こした。オリゴ2および4の投与もまた、脾臓重量の約50%の増加を引き起こした。オリゴ3の投与は、コントロールマウスと比較し、脾臓重量の変化を引き起こさなかった。

【0122】

これらの結果は、さらに、5'-末端がブロックされたオリゴ3は、アクセス可能な5'-末端を有するオリゴと比較し、非常に低い免疫刺激活性を有するという観察を裏付けるものである。これらの結果はまた、オリゴ5～8の投与によっても確認された。オリゴ5、6および8の投与は、脾臓重量の約40～50%の増加を引き起こしたが、オリゴ7の投与の後には脾臓重量の変化は観察されなかった。

【0123】

上記の結果は、オリゴの5'-末端がアクセス可能でない場合に、CpGモチーフを含有するPS-オリゴの免疫刺激活性が、著しく最小化されることを示唆している。オリゴ3および7の免疫刺激活性のこの損失は、ヌクレアーゼ安定性に基づいて説明できない。なぜなら、両方のオリゴが、2つの3'-末端を有し、1つの3'-末端を有するオリゴ1、2、5および6よりも3'-エキソヌクレアーゼ分解に敏感でないためである。

【0124】

ブロックされた3'-末端を有し、エキソヌクレアーゼによる分解に非常に安定であるPS-オリゴ4および8は、同様の免疫刺激活性を示した。オリゴ4およ

び8は、投与後わずか72時間でマウスを屠殺したため、本研究においては確かではないが、インピボで増大した安定性のため、持続的免疫刺激活性を示し得る。投与後72時間より長い時間でマウスを屠殺する場合の研究が進行中である。

【0125】

ここで記載した結果は、興味深く、そしてCpG-PS-オリゴの5'-末端が、免疫刺激活性に重要であることを示唆している。ここで論じたように、我々は、5'-フランキング領域において、修飾2'-または3'-置換リボヌクレオシドによるデオキシヌクレオシドの置換は、免疫刺激活性の増大を引き起こすことを示した。

【0126】

さらに、CpGモチーフに対し直上流（5'-末端）のデオキシヌクレオシドの置換は、著しい抑制を引き起こし、およびCpGモチーフに対し直下流（3'-末端）のデオキシヌクレオシドの置換は、免疫刺激活性には影響しなかった。総合すれば、これらの結果は、免疫刺激に関与する酵素／レセプターが、5'-末端からオリゴのCpGモチーフを認識し、5'-末端へのアクセス性を要求することを示唆している。

【0127】

上記発明を、明瞭性および理解のために、幾分詳細に記載したが、本発明の範囲および付加請求の正確な範囲からはずれることなく、当業者は、この開示を読解することにより、形態および細部における種々の変更が可能であることを理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

種々の位置において、1', 2'-ジデオキシリボース置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図1B】

種々の位置において、1', 2'-ジデオキシリボース置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図2A】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図2B】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図3A】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有する異なったオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図3B】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有する異なったオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図4A】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有する異なったオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図4B】

種々の位置において、1'，2'－ジデオキシリボース置換を有する異なったオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図5A】

種々の位置において、C3－リンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図5B】

種々の位置において、C3－リンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図6A】

種々の位置において、C3－リンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図6B】

種々の位置において、C3－リンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた

脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図7A】

種々の位置において、スパーサー9またはスパーサー18置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図7B】

種々の位置において、スパーサー9またはスパーサー18置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図8A】

種々の位置において、スパーサー9またはスパーサー18置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図8B】

種々の位置において、スパーサー9またはスパーサー18置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図9A】

種々の位置において、アミノリンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図9B】

種々の位置において、アミノリンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図10A】

種々の位置において、アミノリンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図10B】

種々の位置において、アミノリンカー置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図11A】

種々の位置において、3'-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図11B】

種々の位置において、3'-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図12A】

種々の位置において、3'-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図12B】

種々の位置において、3'-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図13A】

種々の位置において、メチルホスホネート置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図13B】

種々の位置において、メチルホスホネート置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図14A】

種々の位置において、メチルホスホネート置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図14B】

種々の位置において、メチルホスホネート置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図15A】

種々の位置において、2'-O-メチルリボヌクレオシドまたは2'-O-メトキシエチル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図15B】

種々の位置において、2'-O-メチルリボヌクレオシドまたは2'-O-メトキシエチル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図16A】

種々の位置において、2'-O-メチルリボヌクレオシドまたは2'-O-メトキシエチル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図16B】

種々の位置において、2'-O-メチルリボヌクレオシドまたは2'-O-メトキシエチル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図17A】

種々の位置において、5'-3'、5'-5'または3'-3'結合置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図17B】

種々の位置において、5'-3'、5'-5'または3'-3'結合置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図17C】

種々の位置において、5'-3'、5'-5'または3'-3'結合置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図18A】

種々の位置において、 β -L-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図18B】

種々の位置において、 β -L-デオキシヌクレオシド置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図19A】

種々の位置において、2'-O-プロパルギル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図19B】

種々の位置において、2'-O-プロパルギル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図20A】

種々の位置において、種々の置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図20B】

種々の位置において、種々の置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図21A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、7-デアザグアニン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図21B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、7-デアザグアニン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図21C】

免疫刺激ジヌクレオチドに、7-デアザグアニン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図22A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、6-チオグアニン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図22B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、6-チオグアニン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図23A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図23B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図24A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図24B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、5-ヒドロキシシトシンまたはN4-エチルシトシン置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図25A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、アラビノフラノシルシトシン（アラシチジン；Ar a-C）置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図25B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、アラビノフラノシルシトシン（アラシチジン；Ar a-C）置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた増殖アッセイの結果を示した図である。

【図26A】

免疫刺激ジヌクレオチドに、4-チオウラシル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図26B】

免疫刺激ジヌクレオチドに、4-チオウラシル置換を有するオリゴヌクレオチドを用いた脾臓重量アッセイの結果を示した図である。

【図27】

水素結合受容基および水素結合供与基として機能するシトシンの官能基を示している、CpG-モチーフの化学構造を示した図である。

【図28】

シトシン（1）およびシトシンアナログ（2～7）の化学構造を示した図である。ヌクレオシドシチジン、デオキシシチジンおよび関連するアナログにおいて、置換基Rは、リボースまたは2'-デオキシリボースである。

【図1 A】

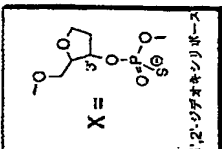
オリゴヌクレオチド ポスカロチオエート及び修飾部位		
オリゴ番号	配列及び修飾	
8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)	<div><div>X = </div><div>1,2-O-isopropylidene-3-O-methyl-β-D-ribofuranose</div></div>
9	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-2)	
10	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-2)	
11	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-3)	
12	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-3)	
13	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-4)	
14	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-4)	
15	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (145-10a)	
16	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-5)	
17	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-6)	
18	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-6)	
19	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-8)	
20	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-12)	
21	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-6)	
22	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-9)	
23	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (145-10b)	

図1A

【図1 B】

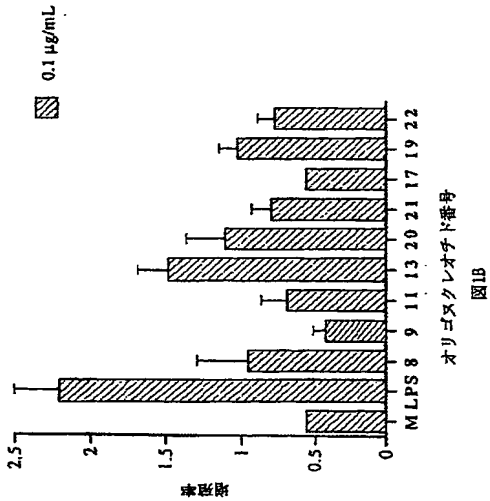


図1B

【図2A】

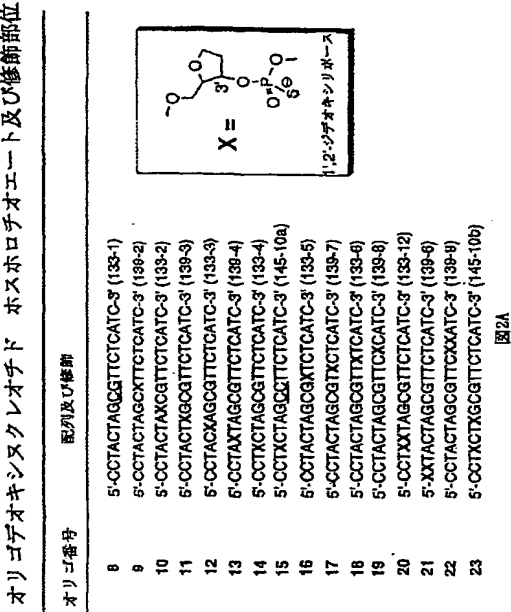


図2A

【図2B】

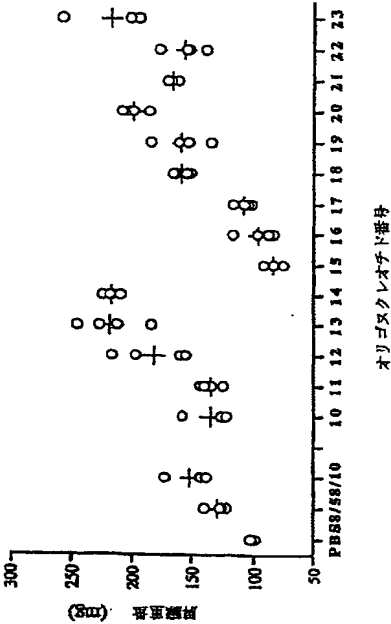


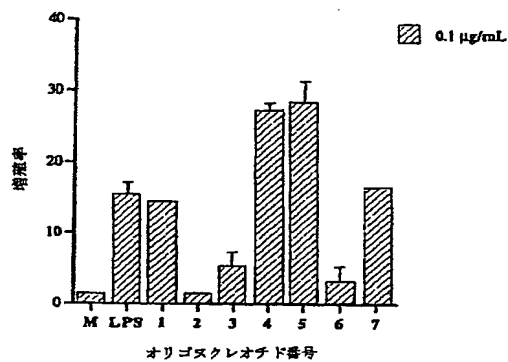
図2B

【図 3 A】

オリゴ糖番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-13)
3	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-2)
4	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-9)
5	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-4)
6	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-6)
7	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3' (131-6)

EX-3A

【図 3 B】



图SB

【図4A】

オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び修飾部位

オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-13)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-2)
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-4)
6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-5)
7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (IS1-6)

X =

2,3-ジデオキシ-2,3-ジホスホリボース

図4A

【図4B】

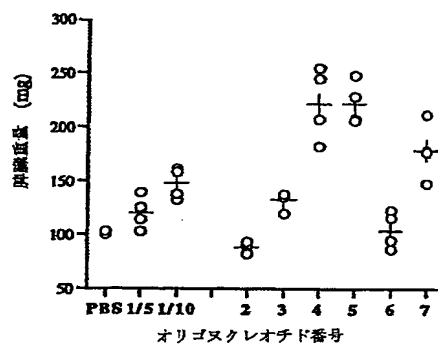


図4B

【図5A】

オリゴヌクレオチド、ホスホロチオエート及び修飾部位

オリゴ番号	配列及び修飾
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-2	6'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-3	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-4	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-5	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-6	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-7	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
137-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
137-3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
137-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'

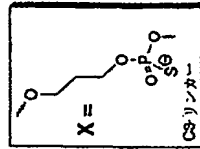
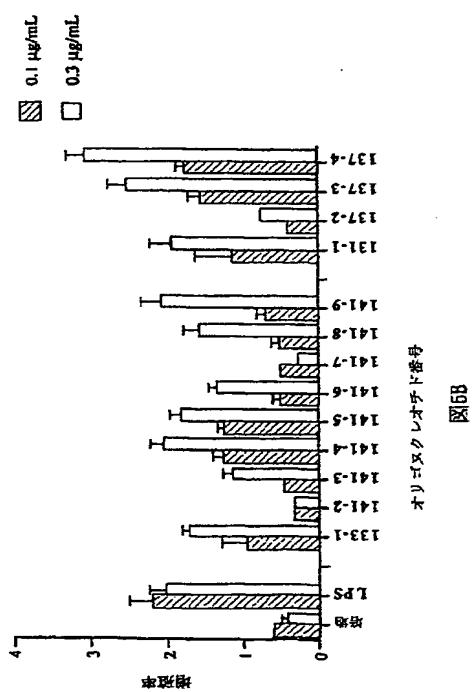


図5A

【図5B】



【図6A】

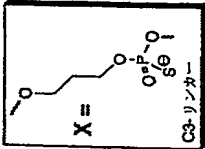
オリゴデオキシヌクレオチド ホスホロチオエート及び修飾部位		
オリゴ番号	配列及び修飾	
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	 <p>X =</p> <p>3'-リンカー</p>
141-2	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-3	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-4	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-5	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-6	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-7	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'	
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
137-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
137-3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
137-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	

図6A

【図6B】

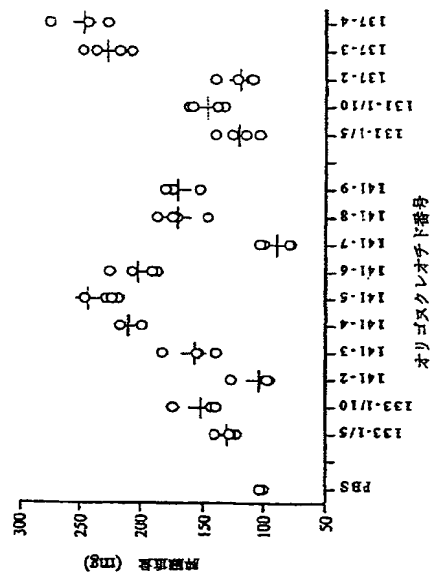


図6B

【図 7 A】

オリゴサキヤシメスクレオラチド ホスホロチオエート及び修飾部位

オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATGTGACGGTTCGTGT-3' (131-1)
2	5'-CTAAGTAGCGTTCTGTBT-3' (153-1)
3	5'-CTATGTGACGGTTCXCTGT-3' (153-2)
4	5'-CTAYGTBACGGTTCGTGT-3' (153-3)
5	5'-CTATCTBACGGTTCGTBT-3' (153-4)
6	5'-CCTACTAGCGTTCATCATC-3' (133-1)
7	5'-CCTACTAGCGTTCATCATC-3' (155-1)
8	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3' (155-2)
9	5'-CCTYCTAGCGTTTGATCATC-3' (155-3)
10	5'-CCTACTAGCGTTCYCATT-3' (155-4)

X =

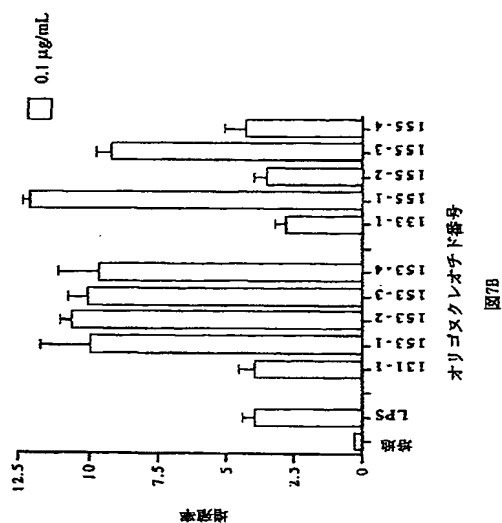
スベ-サ-8

Y =

スベ-サ-18

図 7A

【図 7 B】



(58)

【図8A】

オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び修飾部位

オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGAGGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTACTGTGAGGTTCTCTGT-3' (153-1)
3	5'-CTATCTGAGGTTCTCTGT-3' (153-2)
4	5'-CTATCTGAGGTTCTCTGT-3' (153-3)
5	5'-CTATCTGAGGTTCTCTGT-3' (153-4)
6	5'-CCTACTGAGGTTCTCTGT-3' (155-1)
7	5'-CCTACTGAGGTTCTCTGT-3' (155-2)
8	5'-CCTACTGAGGTTCTCTGT-3' (155-3)
9	5'-CCTACTGAGGTTCTCTGT-3' (155-4)
10	5'-CCTACTGAGGTTCTCTGT-3' (155-5)



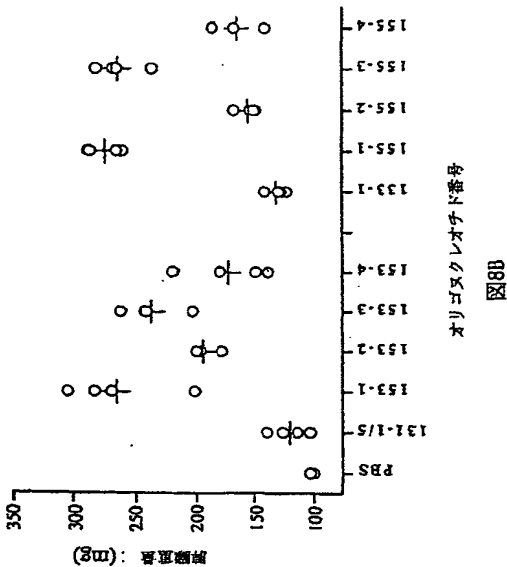
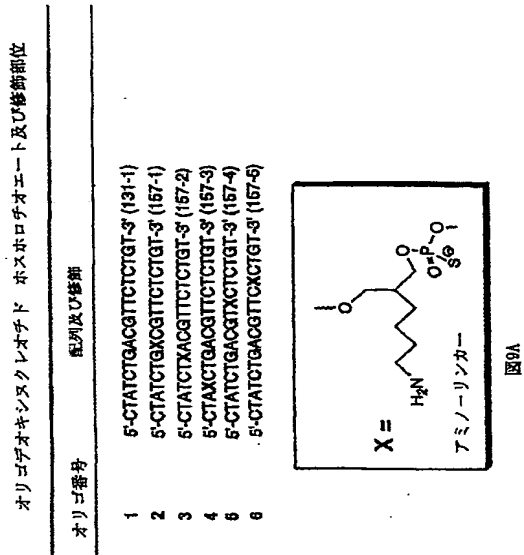
X = 
 Y = 

図8A

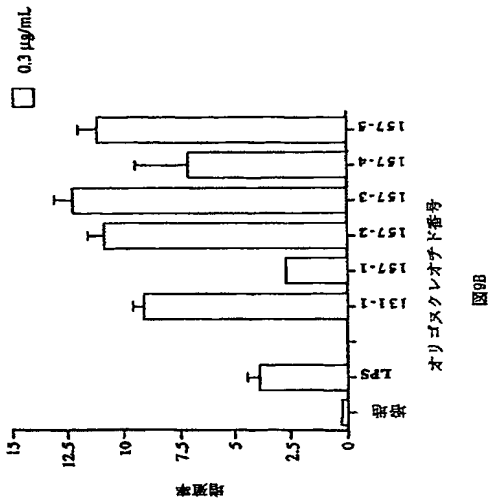
【図8B】



【図9A】



【図9B】



【図10A】

オリゴデオキシヌクレオチド 塩基配列及び修飾部位	
オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (151-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-1)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-2)
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-4)
6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-5)

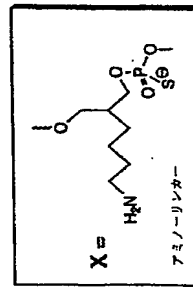


図10A

【図10B】

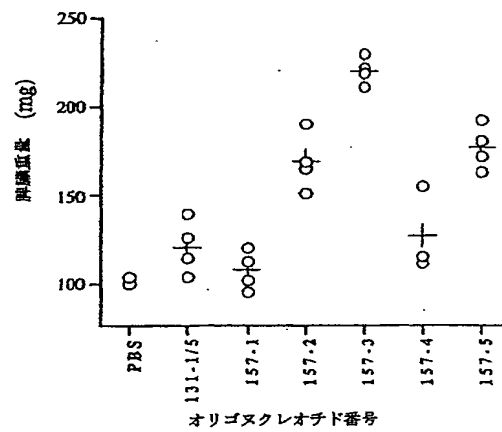
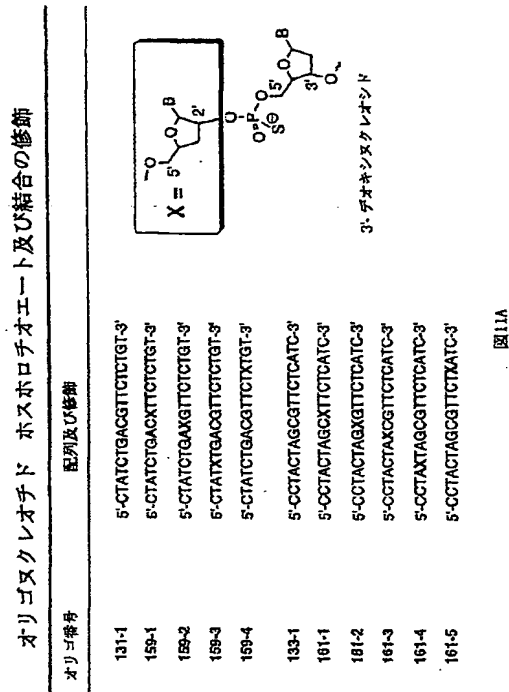
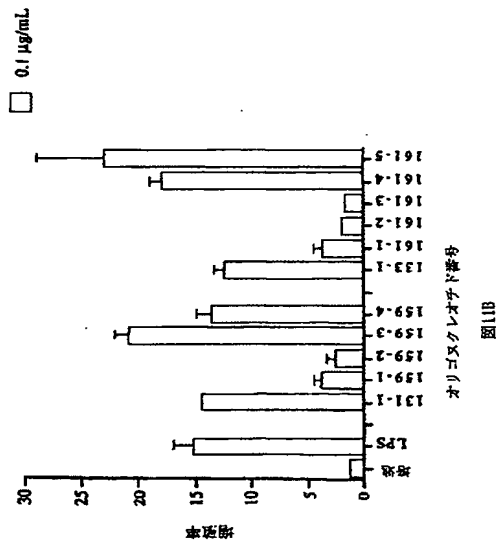


図10B

【図11A】



【図11B】



【図12A】

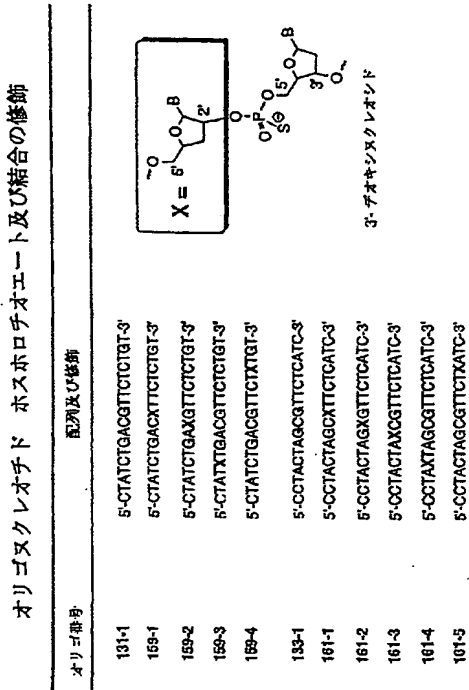


図12A

【図12B】

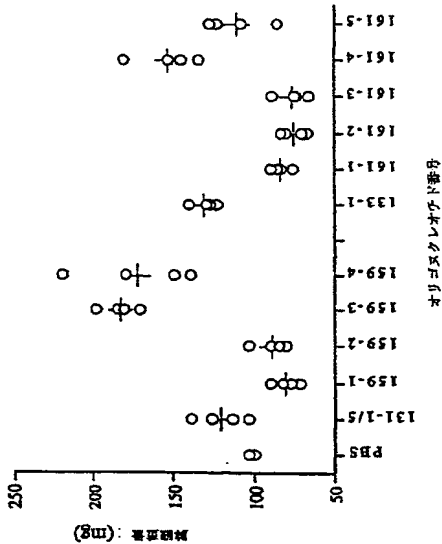
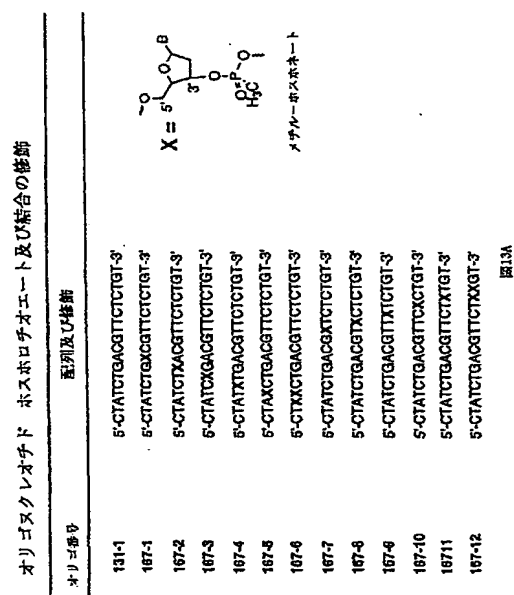
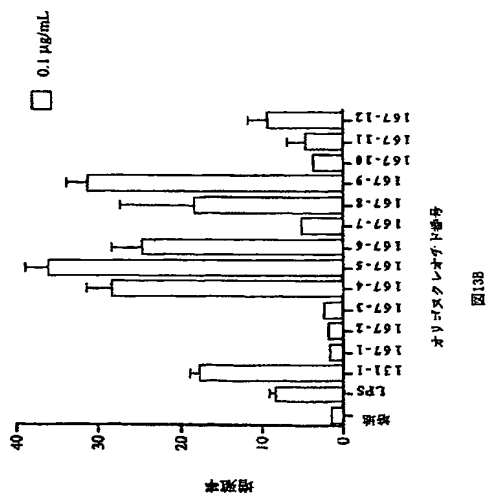


図12B

【図13A】



【図13B】



【図14A】

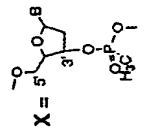
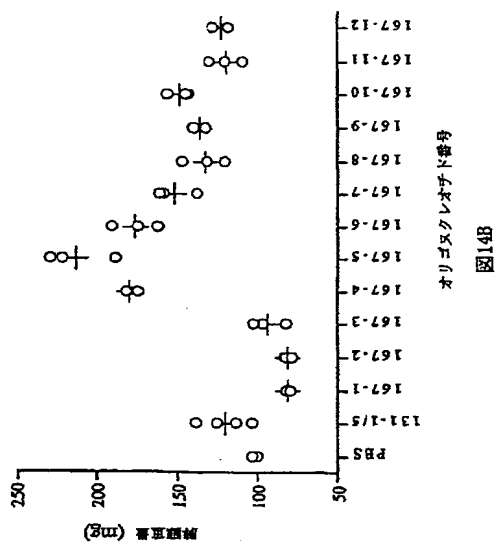
オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び結合の修飾		
オリゴ番号	配列及び修飾	
167-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	 <p>メチル-ホスホエート</p>
167-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-10	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-11	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-12	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	

図14A

【図14B】



【図15A】

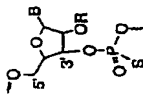
オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び結合の修飾		
オリゴ番号	配列及び修飾	
113-1	5'-TCCATGACGTTCCGTGATGC-3'	 <p> $R_X = 2'-O$-メチルリボヌクレオチド $R_Y = 2'-O$-メチルリボヌクレオチド </p>
23-1	5'-TCCATGACGTTCCGTGATGC-3'	
23-3	5'-TCCATGACGTTCCGTGATGC-3'	
29-2	5'-TTCATGACGTTCCGTGATGC-3'	

図15A

【図15B】

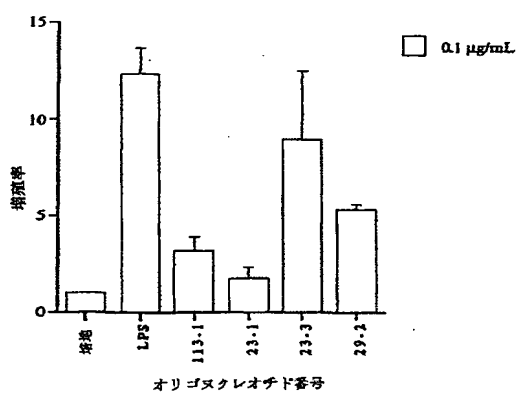


図15B

【図16A】

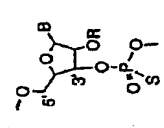
オリゴヌクレオチド、オスホロチオエート及び結合の修飾		
オリゴ番号	配列及び修飾	
113-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'	 <p> $R_X = 2'-O$-メチルリボヌクレオチド $R_Y = 2'-O$-メチルリボヌクレオチド </p>
23-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'	
23-3	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'	
29-2	5'-TTCATGACGTTCTGATGC-3'	

図16A

【図16B】

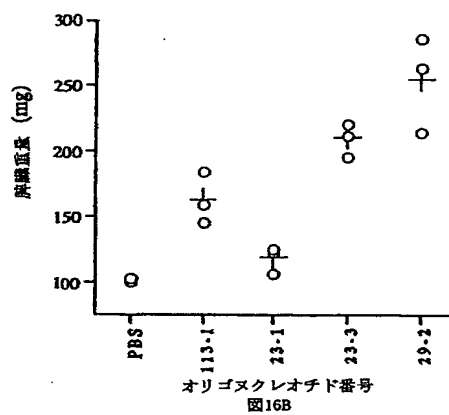


図16B

(67)

【図17A】

オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び結合の修飾

オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
2	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3' — 5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
3	3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5' — 5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
4	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3' — 3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'
5	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'
6	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3' — 5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'
7	3'-TACCGCGTGCACCCCT-5' — 5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'
8	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3' — 3'-TACCGCGTGCACCCCT-5'

図17A

【図17B】

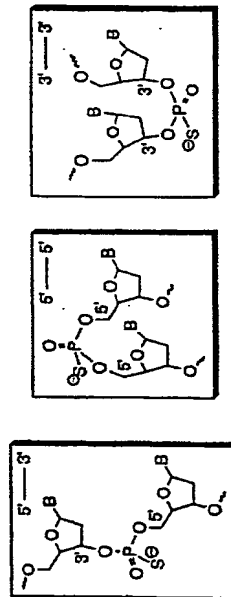
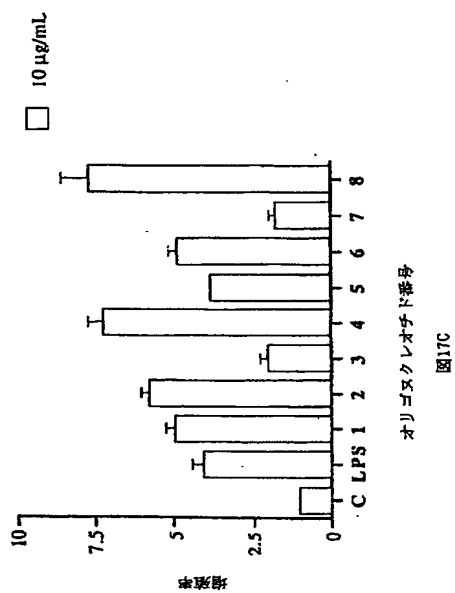


図17B



オリゴ番号	配列及び修飾
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-1	5'-CTATXTCAGCTTCTCTGT-3'
175-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-3	5'-CTAAXTTCAGCTTCTCTGT-3'
175-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-5	5'-CTATCTGAAXTTCTCTGT-3'
175-6	5'-CTATCTACGTTCTCTGT-3'
175-7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (全て β -L-DNAPs)

V81

オリゴヌクレオチド番号	平均分子量 (mg)
285	100
131-1/5	105
131-1/5	115
131-1/5	125
131-1/5	140
175-1	155
175-1	185
175-1	190
175-2	140
175-2	160
175-3	165
175-3	185
175-3	195
175-4	145
175-4	150
175-5	75
175-5	80
175-6	115
175-6	130
175-6	135
175-7	100
175-7	115
175-7	120
175-9	75
175-9	80

図18B

【図 19 A】

	オリゴヌクレオチド	ホスホロチオエート及び結合の修飾
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3'	X =
173-1	5'-CTATXTGACGTTCTGT-3'	X =
173-2	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'	X =

图 19A

【図19B】

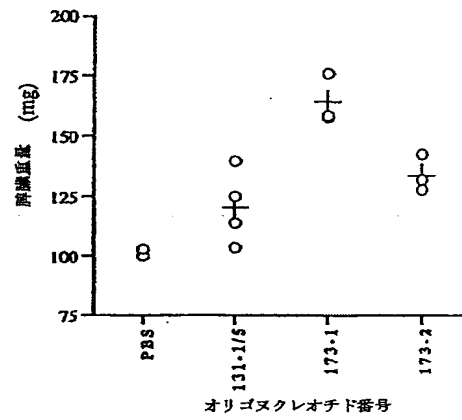


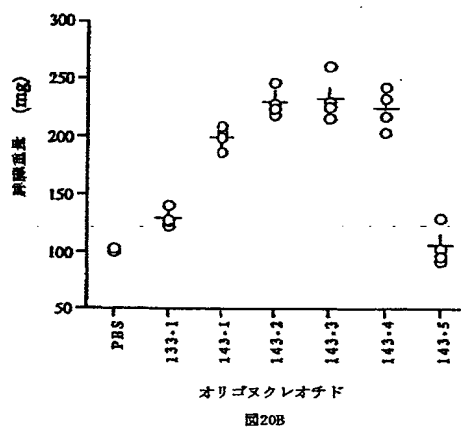
図19B

【図20A】

オリゴヌクレオチド ホスホロチオエート及び結合の修飾	
オリゴ番号	配列及び修飾
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
143-1	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3'
143-2	5'-CCTVYTAGCGTTCTCATC-3'
143-3	5'-CCTZZTAGCGTTCTCATC-3'
143-4	5'-CCTXXTAGCGTVCTCATC-3'
143-5	5'-CCTACTAGGCTTCTCATC-3'
X = 1,2'-ジチオオキシリボース Y = C3'リンカー Z = 3'-OMe V = 2'-OMe	

図20A

【図20B】



【図21A】

オリゴデオキシヌクレオチド ホスホロエート及び結合の修飾

オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 633L)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 636)
4	5'-TCTCCACAGGTTGACCAT-3'
5	5'-TCTCCACAGGTTGACCAT-3' (E 603)
6	5'-CTATXGACGTTCTCTGT-3' (E 639L)

図21A

【図21B】

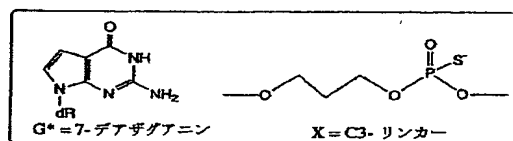
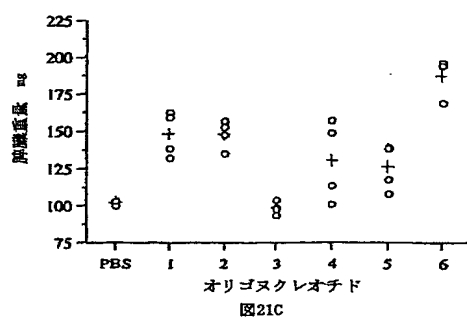


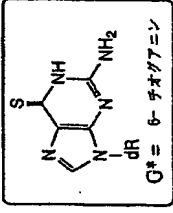
図21B

【図21C】



【図22A】

オリゴヌクレオチド ホスホチオエート及び修飾部位	
オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 682)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 683)



G* = 6-チオグアニン

図22A

【図22B】

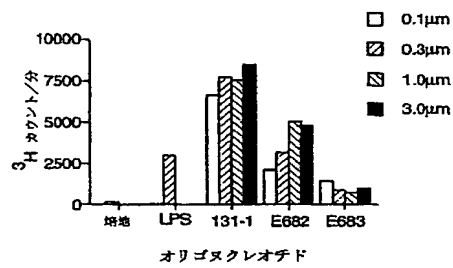


図22B

【図23A】

オリゴヌクレオチド ホスホチオエート及び修飾部位		
オリゴ番号	配列及び修飾	
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTCT-3'	
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTCT-3'	
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTCT-3'	
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTCT-3'	
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTCT-3'	

図23A

【図23B】

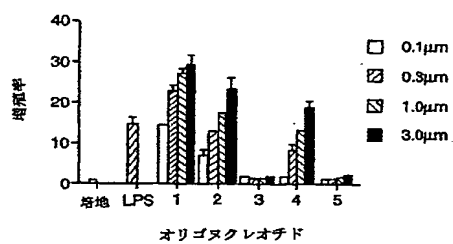


図23B

【図24A】

オリゴデオキシヌクレオチド ホスホロチオエート及び修飾部位	
オリゴ番号	配列及び修飾
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'

C* = 5'-ヒドロキシ-シトシン C** = NH₄-エチル-シトシン

図24A

【図24B】

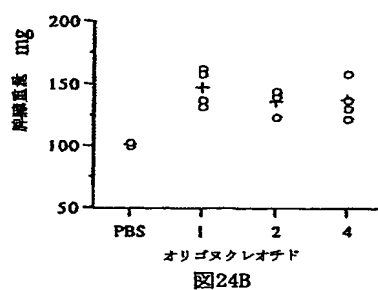


図24B

【図25A】

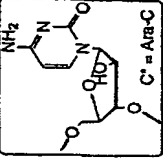
オリゴデオキシヌクレオチド ホスホロチオエート及び修飾部位		
オリゴ番号	配列及び修飾	
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	

図25A

【図25B】

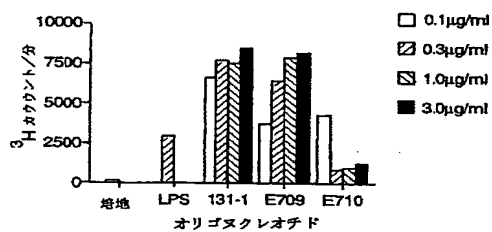
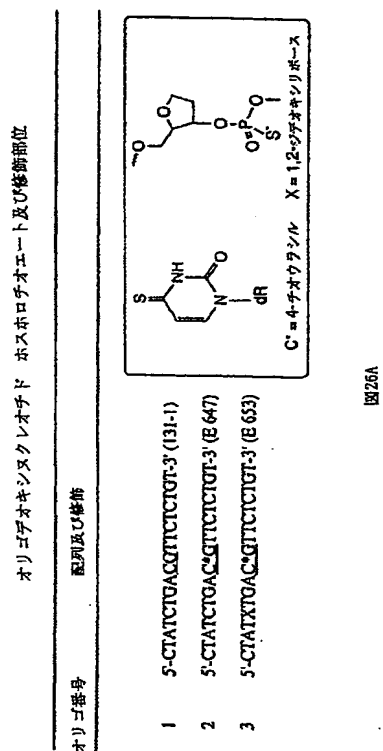
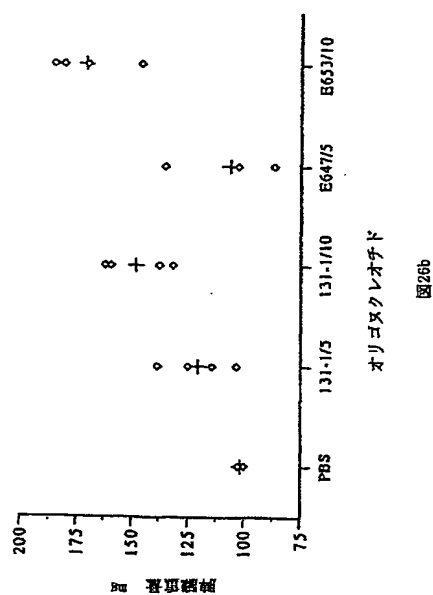


図25B

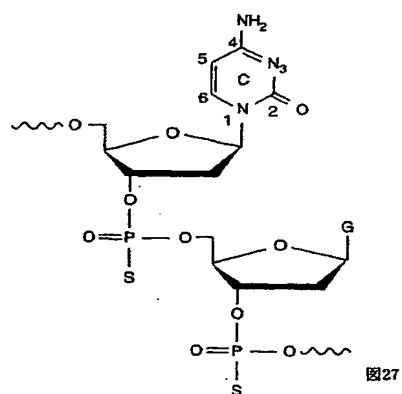
【図26A】



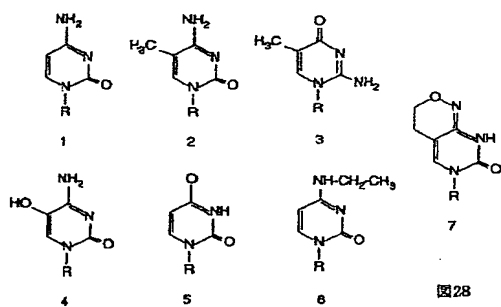
【図26B】



【図27】



【図28】



WO 02/26757

PCT/US91/30337

1/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No. Sequence & Modification

8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)
9	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3' (139-2)
10	5'-CCTACTAXCGTTTCTCATC-3' (133-2)
11	5'-CCTACTXGCGTTTCTCATC-3' (139-3)
12	5'-CCTACXAGCGTTTCTCATC-3' (133-3)
13	5'-CCTAXTAGCGTTTCTCATC-3' (139-4)
14	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-4)
15	5'-CCTXCTAGCGTTTCTCATC-3' (145-10a)
16	5'-CCTACTAGCGXTTCTCATC-3' (133-5)
17	5'-CCTACTAGCGTCTCATC-3' (139-7)
18	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-6)
19	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3' (139-8)
20	5'-CCTXXTAGCGTTTCTCATC-3' (133-12)
21	5'-XXTAGCGTTTCTCATC-3' (139-6)
22	5'-CCTACTAGCGTTCXXATC-3' (139-9)
23	5'-CCTXCTXGCGTTTCTCATC-3' (145-10b)

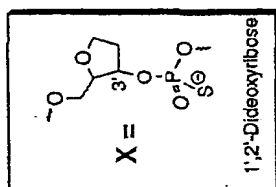


FIG. 1A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

2/53

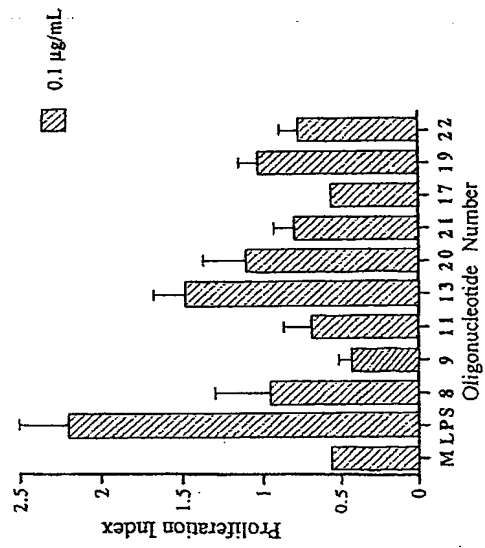


FIG. 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

3/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
8	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-1)
9	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-2)
10	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-2)
11	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-3)
12	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-3)
13	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-4)
14	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-4)
15	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (145-10a)
16	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-5)
17	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-7)
18	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-6)
19	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-8)
20	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (133-12)
21	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-6)
22	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (139-9)
23	5'-CCTACTAGCGTTTCTCATC-3' (145-10b)

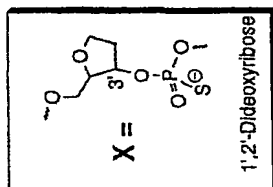


FIG. 2A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30337

4/53

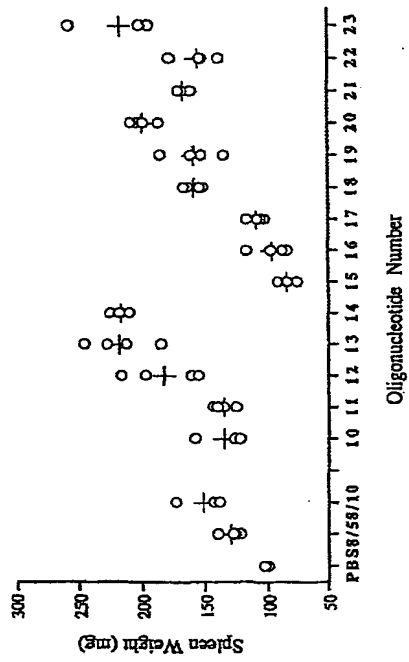


FIG. 2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

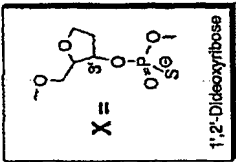
WO 02/26757

PCT/US01/30137

5/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION	
Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGAXGTTTCTCTGT-3' (131-13)
3	5'-CTATCTGXC GTTCTCTGT-3' (131-2)
4	5'-CTATCXGACGTTTCTCTGT-3' (131-3)
5	5'-CTAXCTGACGTTTCTCTGT-3' (131-4)
6	5'-CTATCTGACGXTCTCTGT-3' (131-5)
7	5'-CTATCTGACGTTTCTCTGT-3' (131-6)

X =



1',2'-Dideoxyribose

FIG. 3A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

6/53

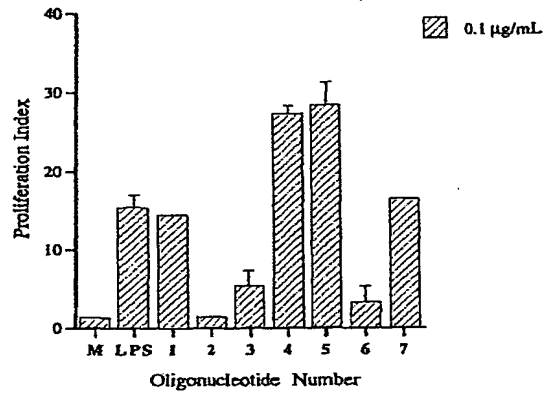


FIG. 3B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3' (131-18)
3	5'-CTATCTGXC GTTCTCTGT-3' (131-22)
4	5'-CTATCTGACGCTTCTCTGT-3' (181-3)
5	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (131-4)
6	5'-CTATCTGACGCTCTCTGT-3' (181-5)
7	5'-CTATCTGACGCTTCTCTGT-3' (181-6)

FIG. 4A

WO 02/26757

PCT/US99/030137

8/53

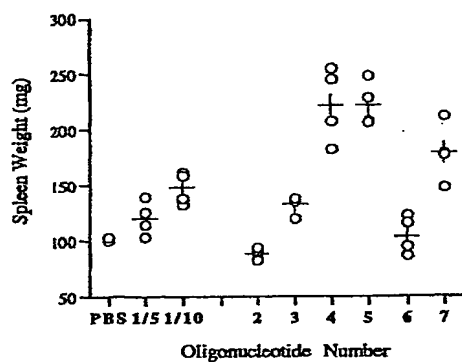


FIG. 4B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

9/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-2	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-8'
141-3	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-4	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-5	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-6	5'-XXTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-7	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTGTGT-3'
137-2	5'-CTATCTGACGTTCTGTGT-3'
137-3	5'-CTATCTGACGTTCTGTGT-3'
137-4	5'-CTATCTGACGTTCTGTGT-3'

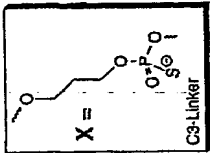


FIG. 5A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

10/53

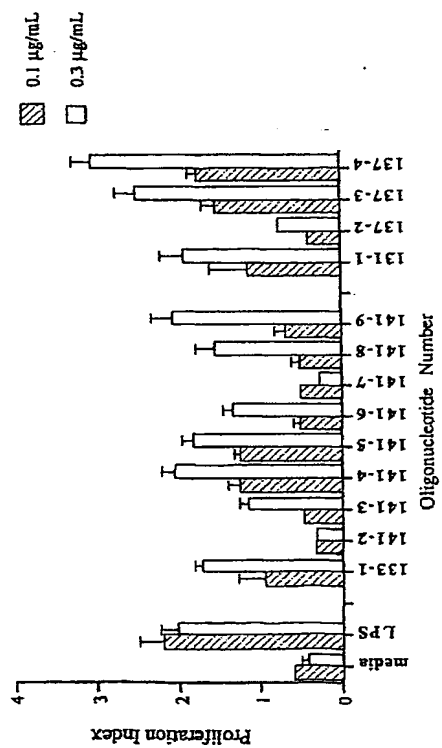


FIG. 5B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

11/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-2	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-3	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-4	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-5	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-6	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-7	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3'
137-2	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3'
137-3	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3'
137-4	5'-CTATCTGACGTTCTGT-3'

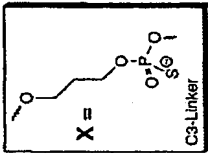


FIG. 6A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

12/53

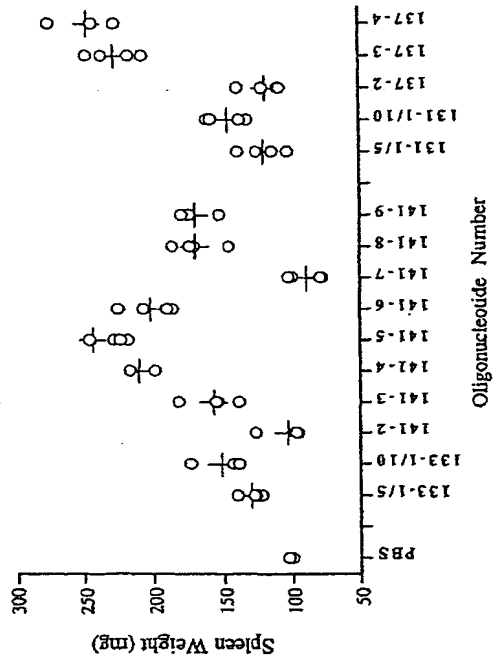


FIG. 6B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30337

13/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (153-1)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (153-2)
4	5'-CTAYCTGACGTTCTCTGT-3' (153-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (153-4)
6	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)
7	5'-CCTXCTAGCGTTCTCATC-3' (155-1)
8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (155-2)
9	5'-CCTYCTAGCGTTCTCATC-3' (155-3)
10	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (155-4)

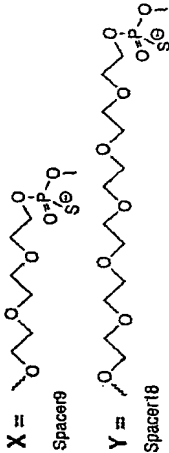


FIG. 7A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

14/53

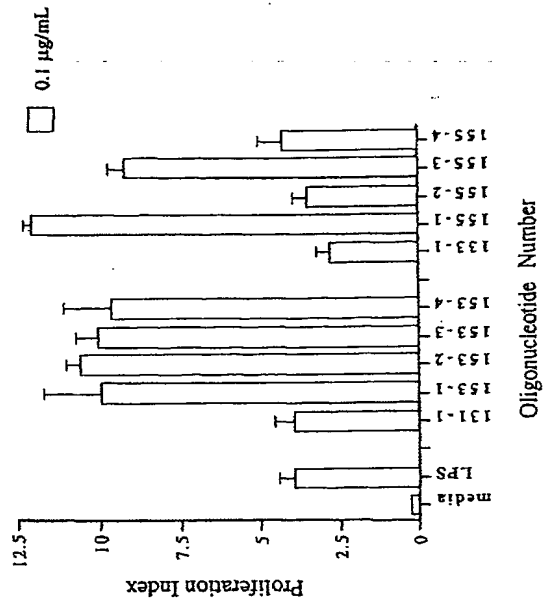


FIG. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

15/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (153-1)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (153-2)
4	5'-CTAYCTGACGTTCTCTGT-3' (153-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (153-4)
6	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)
7	5'-CCTXCTAGCGTTCTCATC-3' (155-1)
8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (155-2)
9	5'-CCTYCTAGCGTTCTCATC-3' (155-3)
10	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (155-4)

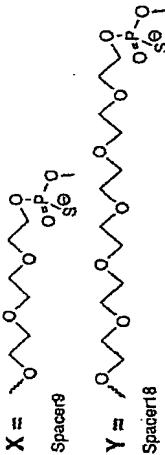


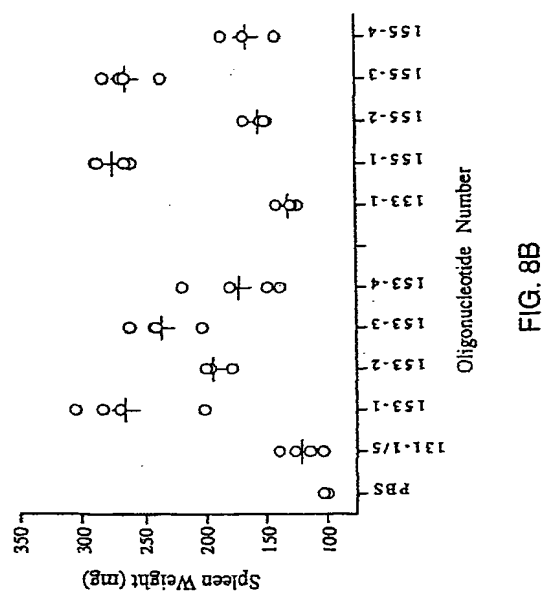
FIG. 8A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

16/53



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

17/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (151-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-1)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-2)
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-4)
6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-5)

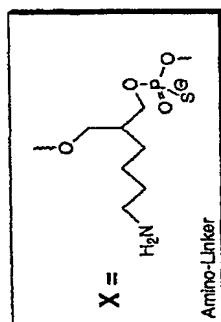


FIG. 9A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

18/53

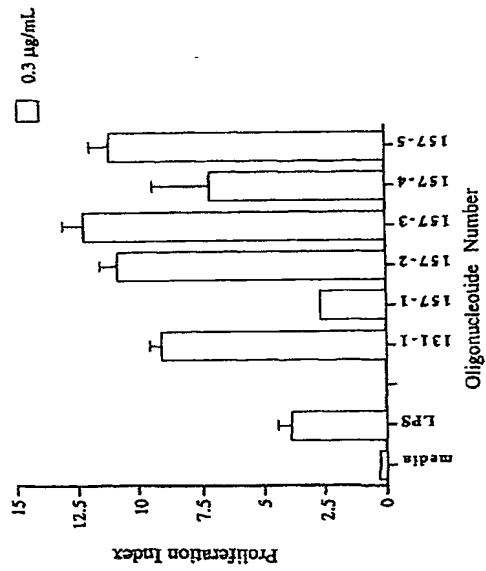


FIG. 9B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

19/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-1)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-2)
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-3)
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-4)
6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (157-5)

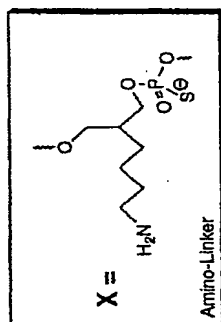


FIG. 10A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

20/53

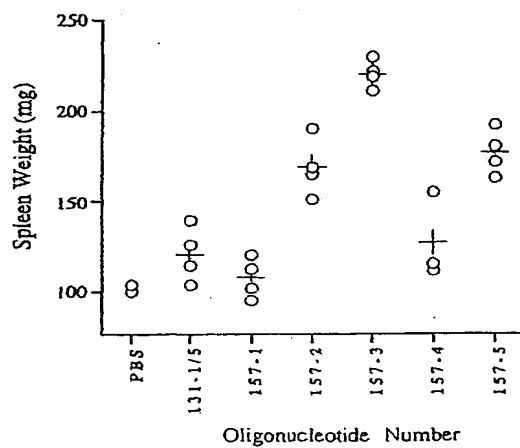


FIG. 10B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US98/30337

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
159-1	5'-CTATCTGACXTTCTCTGT-3'
159-2	5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3'
159-3	5'-CTATXTGACGTTCTCTGT-3'
159-4	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
161-1	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
161-2	5'-CCTACTAGXGTTCTCATC-3'
161-3	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3'
161-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
161-5	5'-CCTACTAGCGTTCTXATC-3'

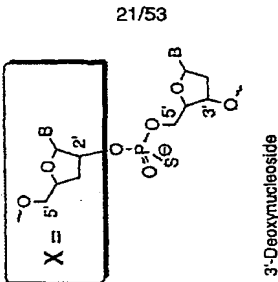


FIG. 11A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/00337

22/53

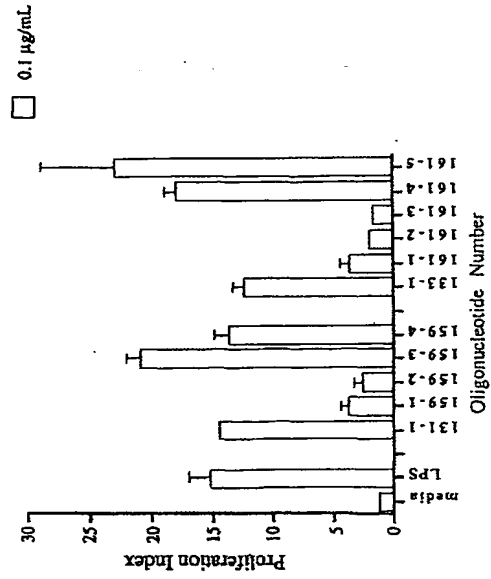


FIG. 11B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
159-1	5'-CTATCTGACXTTCTCTGT-3'
159-2	5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3'
159-3	5'-CTATXCTGACGTTCTCTGT-3'
159-4	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
161-1	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
161-2	5'-CCTACTAGXGTTCTCATC-3'
161-3	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3'
161-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
161-5	5'-CCTACTAGCGTTCTXATC-3'

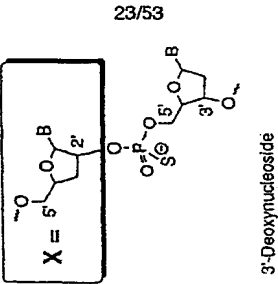


FIG. 12A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

24/53

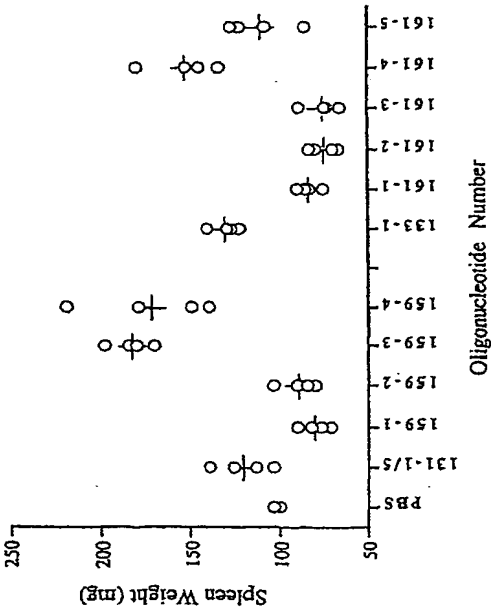


FIG. 12B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-10	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-11	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-12	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'

FIG. 13A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

26/53

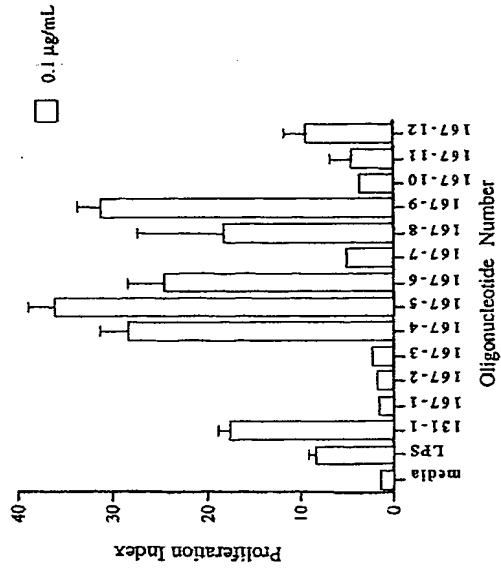


FIG. 13B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

27/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-10	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-11	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-12	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'

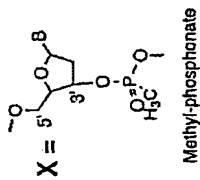


FIG. 14A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

28/53

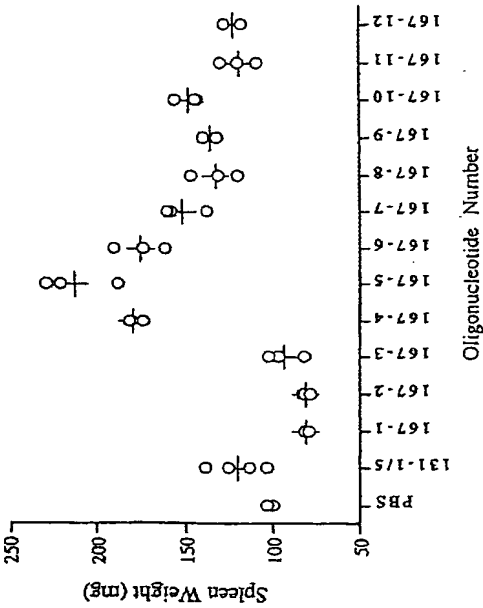


FIG. 14B

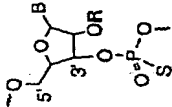
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
113-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'
23-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'
23-3	5'-TCCAXGACGTTCTGATGC-3'
29-2	5'-TYATGACGTTCTGATGC-3'



R_x = 2'-O-Methylribonucleoside
R_y = 2'-O-Methoxyethylthiothymidine

FIG. 15A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

30/53

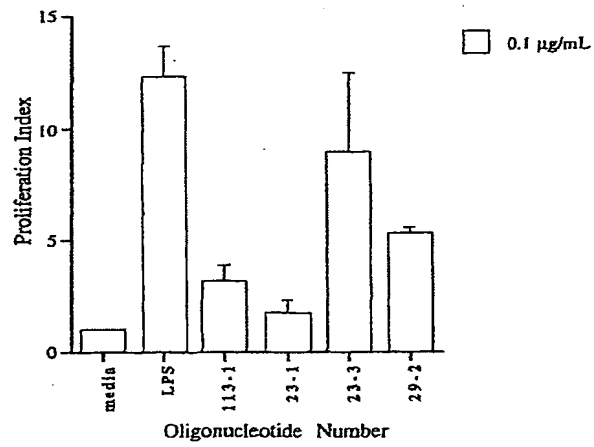


FIG. 15B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
113-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'
23-1	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'
23-3	5'-TCCATGACGTTCTGATGC-3'
29-2	5'-TYYATGACGGTCTGATGC-3'

31/53

R_x = 2'-O-Methylribonucleoside
R_y = 2'-O-Methoxyethoxyribonucleoside

FIG. 16A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

32/53

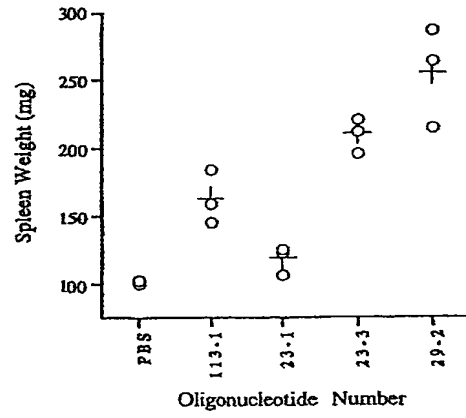


FIG. 16B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
2	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'—5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
3	3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'—5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
4	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'—3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'
5	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'
6	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'—5'-TCCAGCGTGCGCCAT-3'
7	3'-TACCGCGTGCGACCCCT-5'—5'-TCCAGCGTGCGCCAT-3'
8	5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT-3'—3'-TACCGCGTGCGACCCCT-5'

33/53

FIG. 17A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/20137

34/53

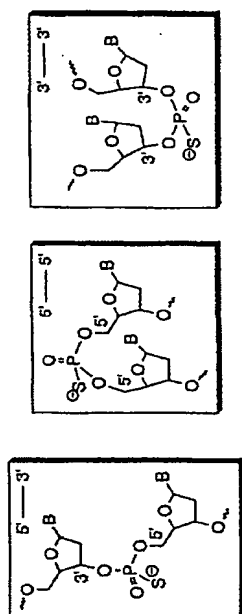


FIG. 17B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

35/53

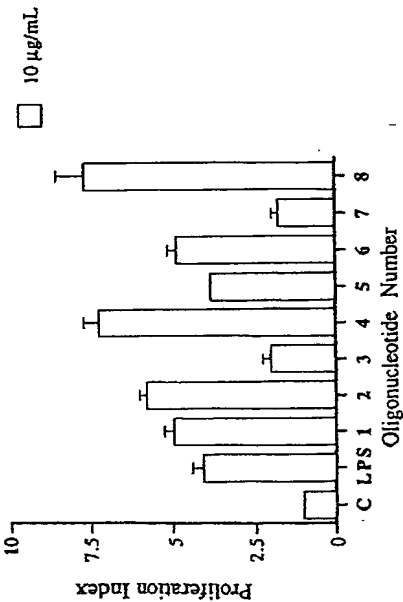


FIG. 17C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-1	5'-CTATXGACGTTCTCTGT-3'
175-2	5'-CTATCTGACGTTCCXCTGT-3'
175-3	5'-CTAXXGACGTTCTCTGT-3'
175-4	5'-CTATCTGACGTTCCXXTGT-3'
175-5	5'-CTATCTGAXXITCTCTGT-3'
175-6	5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3'
175-7	5'-CTATCTGACGTXCTCTGT-3'
175-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (all β -L-DNA/PS)

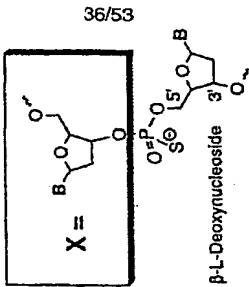


FIG. 18A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/00137

37/53

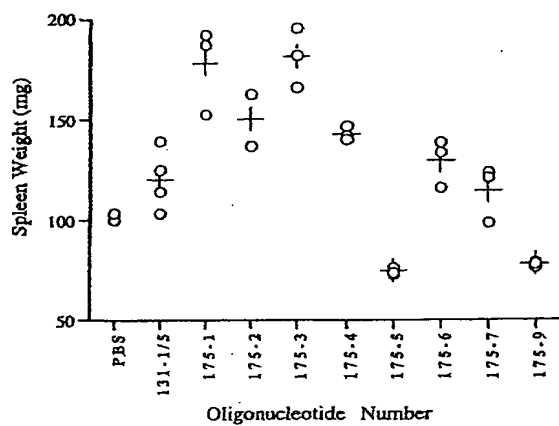


FIG. 18B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

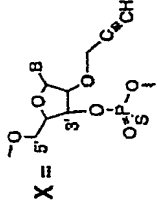
WO 02/26757

PCT/US91/30137

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHICATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
173-1	5'-CTATXGACGTTCTCTGT-3'
173-2	5'-CTATCTGACGTTCTXGT-3'

38/53

X = 

2'-O-Propargyl-ribonucleoside

FIG. 19A

WO 02/26757

PCT/US01/30337

39/53

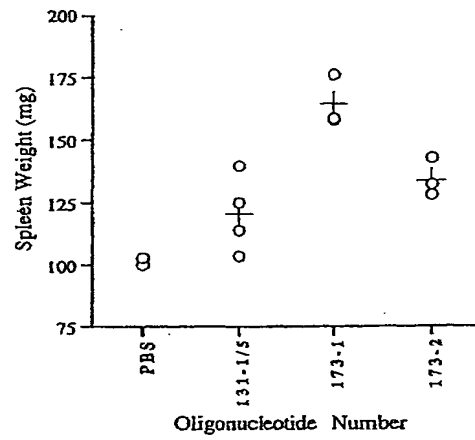


FIG. 19B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

40/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
143-1	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3'
143-2	5'-CCTYYTAGCGTTCTCATC-3'
143-3	5'-CCTZZTAGCGTTCTCATC-3'
143-4	5'-CCTXXTAGCGTVCTCATC-3'
143-5	5'-CCTACTAGGCTTCTCATC-3'
X = 1',2'-Oideoxyribose	
Y = C3'-Linker	
Z = 3'-OMe	
V = 2'-OMe	

FIG. 20A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

41/53

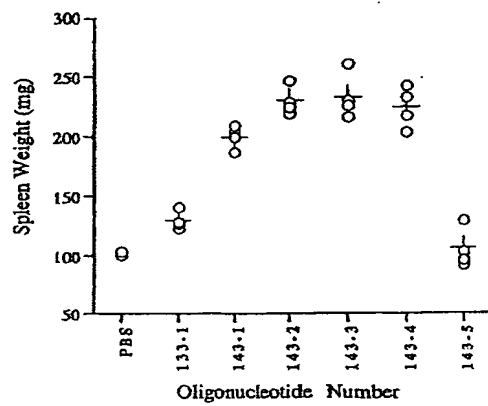


FIG. 20B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

42/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND
MODIFICATION OF LINKAGES

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 633L)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 636)
4	5'-TCTCCACGCGTGGCCAT-3'
5	5'-TCTCCACGCGTGGCCAT-3' (E 603)
6	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 639L)

FIG. 21A

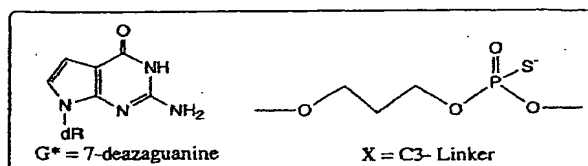


FIG. 21B

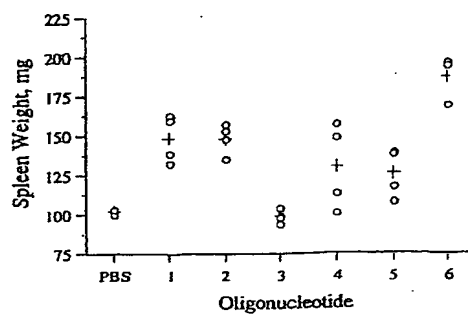


FIG. 21C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

43/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 682)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (E 683)

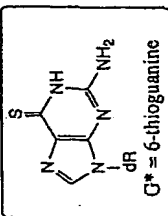


FIG. 22A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

44/53

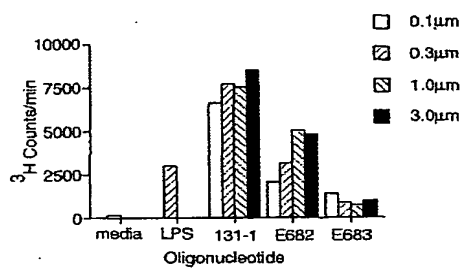


FIG. 22B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

45/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
2	5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'
3	5'-CTATCTGACCC*TTCTCTGT-3'
4	5'-CTATCTGAC**GTTCTCTGT-3'
5	5'-CTATCTGACCC*TTCTCTGT-3'

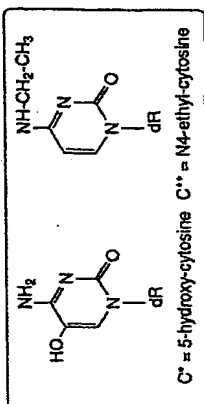


FIG. 23A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

46/53

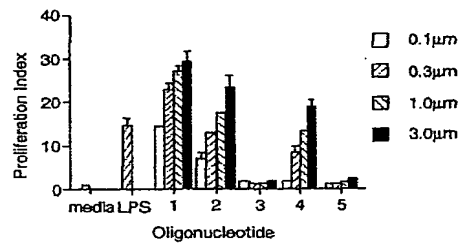


FIG. 23B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

47/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION	
Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
2	5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'
3	5'-CTATCTGACGCTTCTCTGT-3'
4	5'-CTATCTGAC**GTTCTCTGT-3'
5	5'-CTATCTGACGCTTCTCTGT-3'

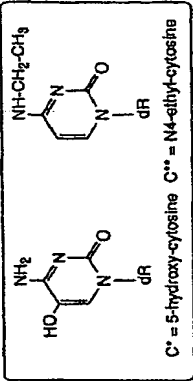


FIG. 24A

WO 02/26757

PCT/US01/30137

48/53

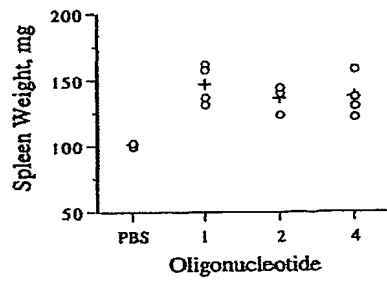


FIG. 24B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

49/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
2	5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'
3	5'-CTATCTGACCTTCTCTGT-3'

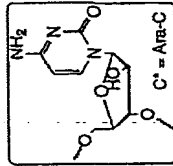


FIG. 25A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

50/53

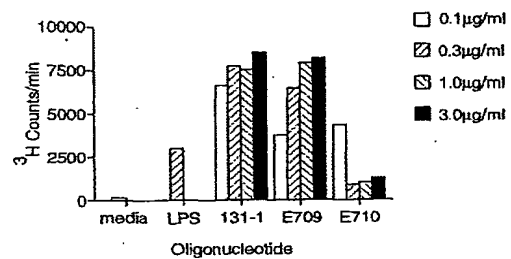


FIG. 25B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137

51/53

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATES AND SITE OF MODIFICATION

Oligo No.	Sequence & Modification
1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (B 647)
3	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (B 653)

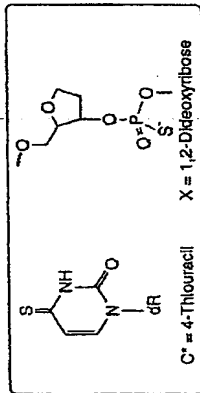


FIG. 26A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US91/30137

52/53

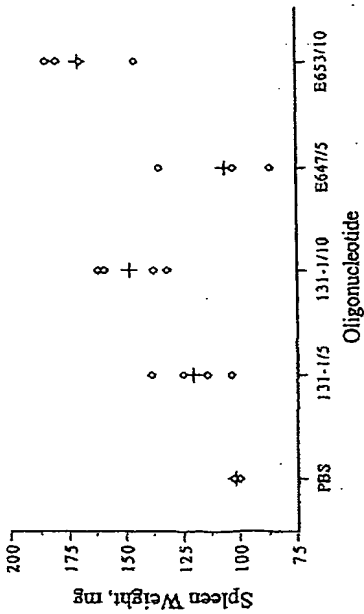
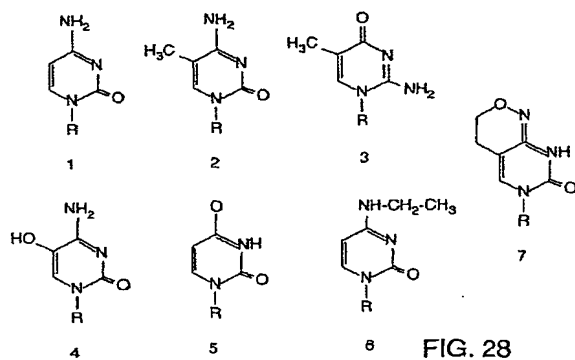
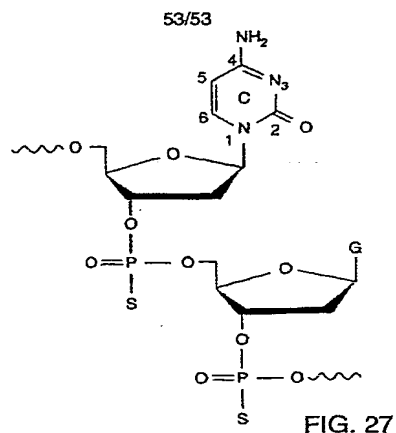


FIG. 26B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/26757

PCT/US01/30137



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月5日(2002.12.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式5'-ピリミジン-プリン-3'、式中、ピリミジンは非天然ピリミジンヌクレオシドであり、およびプリン天然または非天然プリンヌクレオシドである、で表される免疫刺激ジヌクレオチドを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

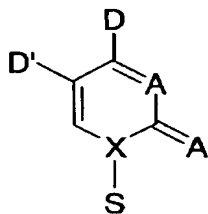
【請求項2】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式C* p G、式中、C*はシチジンアナログであり、Gはグアノシン、2'-デオキシグアノシンまたはグアノシンアナログであり、およびpは、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートからなる群から選択されるヌクレオチド間結合である、で表される免疫刺激ジヌクレオチドを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項3】

非天然ピリミジンヌクレオシドが、式(I)：

【化1】



(I)

式中、Dは水素結合供与体であり、D'は水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子吸引基および電子供与基からなる群から選択され、Aは水素結合受容体または親水基であり、Xは炭素または窒素であり、およびSはペントースまたはヘキソース糖環である、を有し、但し、式(I)で表されるピリミジンヌクレオシドはシチジンまたはデオキシシチジンではない、請求項1に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項4】

非天然ピリミジンヌクレオシドが、非天然に生ずるピリミジン塩基を含む、請求項3に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項5】

非天然に生ずるピリミジン塩基が、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、N4-アルキルシトシンおよび4-チオウラシルからなる群から選択される、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項6】

非天然に生ずるピリミジン塩基が、5-ヒドロキシシトシンおよびN4-エチルシトシンからなる群から選択される、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項7】

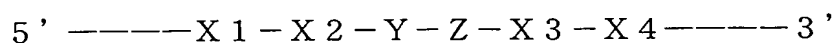
式(I)で表される非天然ピリミジンヌクレオシドが、非天然に生ずる糖部分を含む、請求項4に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項8】

非天然に生ずる糖部分がアラビノースである、請求項7に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項9】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式(II)：



(II)

式中、

Yは、非天然ピリミジンヌクレオシドであり；

Zは、グアノシン、2'-デオキシグアノシンまたは非天然プリンヌクレオシドであり；

X1は、天然に生ずるヌクレオシドまたはC3-アルキルリンカー、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカーおよびβ-L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

X2は、天然に生ずるヌクレオシドまたはアミノリンカーである免疫刺激部分であり；

X3は、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートであり；

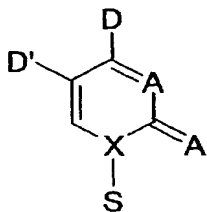
X4は、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートであり；

但し、X1、X2、X3およびX4の少なくとも1つが免疫刺激部分である、で表される免疫刺激ドメインを含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項10】

Yが、式(I)：

【化2】

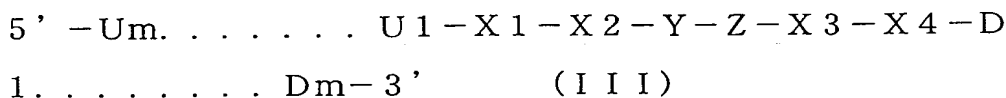


(I)

式中、Dは水素結合供与体であり、D'は水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子吸引基および電子供与基からなる群から選択され、Aは水素結合受容体または親水基であり、Xは炭素または窒素であり、およびSはペントースまたはヘキソース糖環である、を有し、但し、Yはシチジンまたはデオキシシチジンではない、請求項9に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項11】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって、式(III)：



式中：

Yは、非天然ピリミジンヌクレオシドであり；

Zは、グアノシン、2'-デオキシグアノシンまたは非天然プリンヌクレオシドであり；

各Xは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；

式中、Um-U1は、上流増強ドメインを示し、ここで、各Uは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；

式中、D1-Dmは、下流増強ドメインを示し、ここで、各Dは、独立して、天然に生ずるヌクレオシドまたは免疫刺激部分であり；および

mは、各場合において、0～30の数を示す、

で表される配列を含む、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項12】

少なくとも1つのX、UまたはDが、免疫刺激部分である、請求項11に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項13】

X1が、天然に生ずるヌクレオシドまたはC3-アルキルリンカー、2-アミノブチルー1，3-プロパンジオールリンカーおよびβ-L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

X2が、天然に生ずるヌクレオシドまたはアミノリンカーである免疫刺激部分であり；

X3が、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートであり；

X4が、天然に生ずるヌクレオシドまたはヌクレオシドメチルホスホネートであり；

U1が、天然に生ずるヌクレオシド、1'，2'-ジデオキシリボースまたはC3-リンカーであり；

U2が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1'，2'-ジデオキシリボース、C

3-リンカー、スペーサー18、3'-デオキシヌクレオシド、ヌクレオシドメチルホスホネート、 β -L-デオキシヌクレオシドおよび2-O-プロパルギルリボヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

U3が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1', 2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スペーサー9、スペーサー18、ヌクレオシドメチルホスホネートおよび2'-5'結合からなる群から選択される免疫刺激部分であり；

D1が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1', 2'-ジデオキシリボースおよびヌクレオシドメチルホスホネートからなる群から選択される免疫刺激部分であり；

D2が、天然に生ずるヌクレオシドまたは1', 2'-ジデオキシリボース、C3-リンカー、スペーサー9、スペーサー18、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカー、ヌクレオシドメチルホスホネートおよび β -L-デオキシヌクレオシドからなる群から選択される免疫刺激部分であり；および

D3が、天然に生ずるヌクレオシドまたは3'-デオキシヌクレオシド、2'-O-プロパルギルリボヌクレオシドおよび2'-5'結合からなる群から選択される免疫刺激部分である；

請求項12に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項14】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物であって：

式5'-ピリミジン-プリン-3'、式中、ピリミジンは非天然ピリミジンヌクレオシドであり、およびプリンは天然または非天然プリンヌクレオシドである、で表される免疫刺激ジヌクレオチド；

3'-3'結合；および

1つまたは2つのアクセス可能な5'-末端；

を含み、但し、オリゴヌクレオチドは、HIV-1のgagまたはtat遺伝子に相補的ではない、前記免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項15】

オリゴヌクレオチドが、2つのアクセス可能な5'-末端を含む、請求項14に記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項16】

非天然に生ずるピリミジン塩基を含むジヌクレオチドアナログを免疫刺激ドメインに導入することを含む、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項17】

免疫刺激部分を免疫刺激ドメインおよび／または増強ドメインに導入することを含む、免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項18】

3' - 3' 結合をオリゴヌクレオチドに導入することを含む、請求項1～15のいずれかに記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項19】

患者に免疫応答を引き起こすための方法であって、請求項1～15のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項20】

オリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物が、抗生物質、抗原、アレルゲン、ワクチン、抗体、細胞毒性剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、遺伝子療法ベクター、DNAワクチン、アジュバントまたはこれらの組み合わせと組み合わせて投与される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物が、抗原またはワクチンと結合している、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

結合がオリゴヌクレオチド化合物の3' - 末端へのものである、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

病原体による疾患を有する患者を治療的に処置するための方法であって、請求項

1～15のいずれかに記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項24】

病原体がウイルスである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

病原体が寄生虫である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

病原体がバクテリアである、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

癌患者を処置するための方法であって、請求項1～15のいずれかに記載の免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項28】

免疫刺激オリゴヌクレオチド化合物が、化学療法の化合物と組み合わせて投与される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

自己免疫疾患を処置するための方法であって、請求項1～15のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項30】

自己免疫疾患が自己免疫性の喘息である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

気道炎症またはアレルギーを処置するための方法であって、請求項1～15のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドアナログ免疫刺激化合物を患者に投与することを含む、前記方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

これらの構成において、U6の免疫刺激部分は、免疫刺激ジヌクレオチドまたはジヌクレオチドアナログから8位置上流であり、およびD4の免疫刺激部分は、免疫刺激ジヌクレオチドまたはジヌクレオチドアナログから6位置下流である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Appl. No. PCT/US 01/30137
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07H21/00 A61K31/70 A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both, national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07H A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Class or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO Q ET AL: "Immunostimulatory activity of CpG containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide is modulated by modification of a single deoxynucleoside", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 10, no. 10, May 2000 (2000-05), pages 1051-1054, XP004204603 ISSN: 0960-894X cited in the application	9, 24, 26, 27, 30-38
Y	the whole document, in particular Table 1 and page 1053, 2. column, last paragraph - page 1054, 1. column, line 6 — —/—	1-4, 7, 9-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claims or which is used to establish the publication date of another claim or other special action (as specified) "D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step which the document is, taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2002		Date of mailing of the international search report 17/09/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 10 Patent Court 2 NL - 2200 LM The Hague Tel. (+31)-70 940-2442, Tel. 31 531 531 531 Fax: (+31)-70 940-3016		Authorized officer Fitz, W

Form PCT/ISA/210 (prevised January 1999)

page 1 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 PCT/US 01/30137
 PCT/US 01/30137

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
X	ZHAO Q ET AL: "Site of Chemical Modifications in CpG Containing Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide Modulates its Immunostimulatory Activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 24, 20 December 1999 (1999-12-20), pages 3453-3458, XP004185533 ISSN: 0960-894X cited in the application	9, 24, 26, 27, 30-38
Y	the whole document, in particular: Table 1, and page 3457, 5. paragraph	1-4, 7, 9-38
X	AGRAWAL S ET AL: "ANTISENSE THERAPEUTICS" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 2, no. 4, 1998, pages 519-528, XP000979488 ISSN: 1367-5931	1-4, 7, 12, 23, 24, 26, 27, 30-38
Y	page 523, 1. column, last paragraph; page 524, Figure 4	1-4, 7, 9-38
X	CHAI X, C. ET AL.: "3'-3'-LINKED OLIGONUCLEOTIDES: SYNTHESIS AND STABILITY STUDY" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 6, no. 7, 1996, pages 827-832, XP002211794	25-27, 30-38
Y	page 827, last 8 lines and page 828, 2. paragraph, first two lines and Table 1	1-4, 7, 9-38
Y	KLINMAN D M: "Therapeutic applications of CpG -containing oligodeoxynucleotides" ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 8, 1998, pages 181-184, XP002128519 ISSN: 1087-2906 the whole document	1-4, 7, 9-38
P, X	YU D ET AL: "Accessible 5'-end of CpG-containing Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides is essential for immunostimulatory activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 10, no. 23, 4 December 2000 (2000-12-04), pages 2585-2588, XP004219767 ISSN: 0960-894X the whole document	20, 21, 25-38

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor Application No.
PCT/US 01/30137

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KANDIMALLA EKAMBAR R ET AL: "Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, 88, vol. 9, March 2001 (2001-03), pages 807-813, XP002198015 ISSN: 0968-0896 Figure 1	1-6, 12, 23, 26, 30-38

Form PCT/ISA/210 (Continuation of International Search Report)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/30137
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Not: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 26-38 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims Not: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Not: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:</p>	
<p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. </p>	

Form PCT/ISA/210 (Continuation of first sheet) (1) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/35

A 6 1 K 39/35

4 C 0 8 6

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 K 47/46

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 11/00

A 6 1 K 47/46

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 33/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 33/00

A 6 1 P 37/08

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 15/09

A 6 1 P 37/08

C 1 2 N 15/00 Z N A A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ツァオ, キーヤン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 7 7 2、サウスボロー、サウスウッド ドライブ 1 1

(72) 発明者 ユー, ドン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 5 8 1、ウエストボロー、インディアン ボンド ロード 2 5

(72) 発明者 アグラワル, サディール

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 5 4 5、シュルーズバリー、ランプライター ドライブ 6 1

F ターム (参考) 4B024 AA01 CA01 GA30 HA17

4C057 BB02 CC01 DD01 MM04

4C076 CC07 CC27 CC31 CC32 CC34 CC35 EE59

4C084 AA17 NA14 ZA592 ZB082 ZB132 ZB262 ZB322 ZB332 ZB352

4C085 AA03 BA01 BB03 BB23 DD86 FF24

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZB08 ZB26

ZB32 ZB33 ZB35